

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
ARENGUBIOLOOGIA ÕPPETOOL

Kirstin Karis

**Guaniini nukleotiidivahetusfaktor RIC8 roll hiire kortikogeneesis**

Bakalaureusetöö

Juhendajad MSc Keiu Kask  
PhD Tambet Tõnissoo

TARTU 2014

# SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID .....	4
SISSEJUHATUS .....	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE .....	6
1.1. Neurogenees.....	6
1.1.1. Neuraalsed eellasrakud .....	6
1.1.2. Neuronite migreerumine ja ajukoore teke .....	7
1.2. Ajukelmed.....	8
1.2.1. Ajukelmete üldine iseloomustus.....	8
1.2.2. Ajukelmete funktsioonid aju arengus .....	9
1.3. Guaniini nukleotiidivahetusfaktor RIC8.....	10
1.3.1. RIC8 üldine iseloomustus.....	10
1.3.2. Heterotrimeersed G-valgud .....	11
1.3.3. RIC8 biokeemiline funktsioon .....	11
1.3.4. RIC8 funktsioon närvisüsteemis.....	12
1.3.5. RIC8 funktsioon adhesioonis ja migratsioonis.....	13
2. EKSPERIMENTAALNE TÖÖ .....	15
2.1. Töö eesmärgid.....	15
2.2. Materjal ja meetodika .....	15
2.2.1. Töös kasutatud hiireliinid .....	15
2.2.2. Embrüote dissekteerimine .....	15
2.2.3. Embrüote genotüpiseerimine .....	16
2.2.4. Parafiinlõikude valmistamine .....	17
2.2.5. Külmlõikude valmistamine.....	17
2.2.6. Histoloogiliste preparaatide valmistamine .....	18
2.2.7. Immunohistokeemiline analüüs parafiinlõikudele.....	18
2.2.8. Immunohistokeemiline analüüs külmlõikudele.....	19
2.2.9. Koelõikude pildistamine.....	19
2.3. Tulemused.....	20
2.3.1. RIC8 lokalisatsiooni uurimine otsajus.....	20
2.3.2. Otsaju korteksi histoloogiline analüüs.....	21
2.3.3. Basaalmembraani markeri Laminiin-1 lokalisatsiooni analüüs.....	22
2.4. Arutelu .....	25
KOKKUVÕTE .....	28

SUMMARY .....	29
TÄNUSÕNAD .....	31
KIRJANDUSE LOETELU.....	32
LIHTLITSENTS.....	40

## KASUTATUD LÜHENDID

BM – *basement membrane*, basaalmembraan

bRGC – *basal radial glia cell*, basaalne radiaalglia rakk

BSA – *bovine serum albumin*

cAMP – *cyclic adenosine monophosphate*, tsükliline adenosiin monofosfaat

CP – *cortical plate*, kortikaalplaat

CXCL12 – *C-X-C motif chemokine 12*

DAG – *diacyl-glycerol*, diatsüülglütserool

DAPI – *4',6-diamidino-2-phenylindole*

ECM – *extracellular matrix*, ekstratsellulaarne maatriks

ES – *embryonic stem cells*, embrüonaalsed tüvirakud

Foxc1 – *forkhead box C1*

GAP – *GTPase activating protein*, GTPaasi aktiveeriv valk

GEF – *guanine nucleotide exchange factor*, guaniini nukleotiidivahetusfaktor

GPCR – *G-protein coupled receptor*, G-valguga seotud retseptor

GPR56 – *G-protein coupled receptor 56*

HE – *hematoxylin-eosin*, hematoksüliin-eosiin

IPC – *intermediate precursor cell*, intermediaalne ehk basaalne eellasrakk

KNS – kesknärvisüsteem

MZ – *marginal zone*, marginaaltsoon

NCAM – *neural cell adhesion molecule*, neuraalsete rakkude adhesioonimolekul

PBS – *phosphate buffered saline*, fosfaatpuhvriga soolalahus

PDGF – *platelet-derived growth factor*

PFA – *paraformaldehyde*, paraformaldehüüd

RGS – *regulators of G protein signaling*, G-valgu signaaliülekanne regulaator

RIC8 – *resistant to inhibitors of cholinesterase 8*

RTK – *receptor tyrosine kinase*, retseptor-türosiinkinaas

SDF1 – *stromal cell-derived factor 1*

SNP – *short neural precursor*, lühike neuraalne eellasrakk

SP – *subplate*, alamplaat

SVZ – *subventricular zone*, subventrikulaartsoon

TAE – *Tris-acetate-EDTA*, Tris-atsetaat-EDTA

TGF-β – *transforming growth factor beta*

VZ – *ventricular zone*, ventrikulaartsoon

## SISSEJUHATUS

Imetaja närvisüsteemi normaalse arengu ja talitluse tagavad kompleksed ja omavahel tihedalt seotud protsessid. Üheks selliseks oluliseks protsessiks on närvirakkude juurdekasv neurogeneesi alguses, mil rakkude korrektne ja õigeaegne jagunemine ning migreerumine on vajalik imetaja kuuekihilise suurajukoore moodustumiseks. Suurajukoorel on oluline funktsioon õppimises, aistingute ja tajude tekkes ning täpsete tahtlike liigutuste sooritamises. Häired ajukoore rakkude migratsioonis võivad tekitada mitmesuguseid aju väärarenguid, nagu näiteks hüdrotsefaaliat, mikrotsefaaliat ja *cobblestone* lissentsefaaliat, mille puhul neuronid kalduvad kõrvale oma tavapärasest migreerumisest, läbivad basaalmembraani katkeid ning moodustavad aju pinnal neuronaalseid ektoopiaid.

Rakkude jagunemist, adhesiooni ning migreerumist õigetesse positsioonidesse koordineerivad keerulised signaalvõrgustikud. Oluline roll neuronite signaali ülekannetes on G-valkudel. Heterotrimeersed G-valgud edastavad signaale väliskeskonnast efektormolekulideni, mida vahendavad membraanseoseline retseptor ja sellega seondunud ligand. G-valkude signalisatsiooniraja üheks põhiliseks regulaatoriks on guaniini nukleotiidivahetusfaktor RIC8. On leitud, et RIC8 pikendab ja võimendab  $G\alpha$  subühiku poolt edastatavat signaali. Katsed hiirtega on näidanud, et RIC8 mahasurumine neuraalsetest eellasrakkudest põhjustab erinevaid arengudefekte ning seetõttu on selle valgu uurimine väga oluline.

Närvisüsteemi arengus on järjest rohkem tähelepanu pööratud ka ajukelmete kriitilisele funktsioonile. Kui tavapäraselt on ajukelmete esmaseks rolliks peetud kesknärvisüsteemi kaitsmist, siis hiljutistes uuringutes on leitud, et ajukelmed mõjutavad aju arengus erinevate signaalfaktorite vabastamisega neuraalsete eellasrakkude ja neuronite migratsiooni. Häired ajukelmete arengus võivad põhjustada otsajus arengudefekte.

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks on teoreetilises osas anda ülevaade neuraalsete eellasrakkude diferentseerumisest, rakkude migratsioonist ja selle tulemusena ajukoore moodustumisest. Samuti keskendutakse põhjalikumalt ajukelmete funktsioonidele närvisüsteemi arengus. Olulist tähelepanu pööratakse guaniini nukleotiidivahetusfaktori RIC8 rollile rakkude migratsioonis ning adhesioonis. Eksperimentaalses osas uuritakse neurospetsiifiliste *Ric8* konditsionaalsete *NestinCre;RIC8<sup>lacZ/lox</sup>* hiirte ots- ja keskaju arengut erinevates arengustadiumites.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

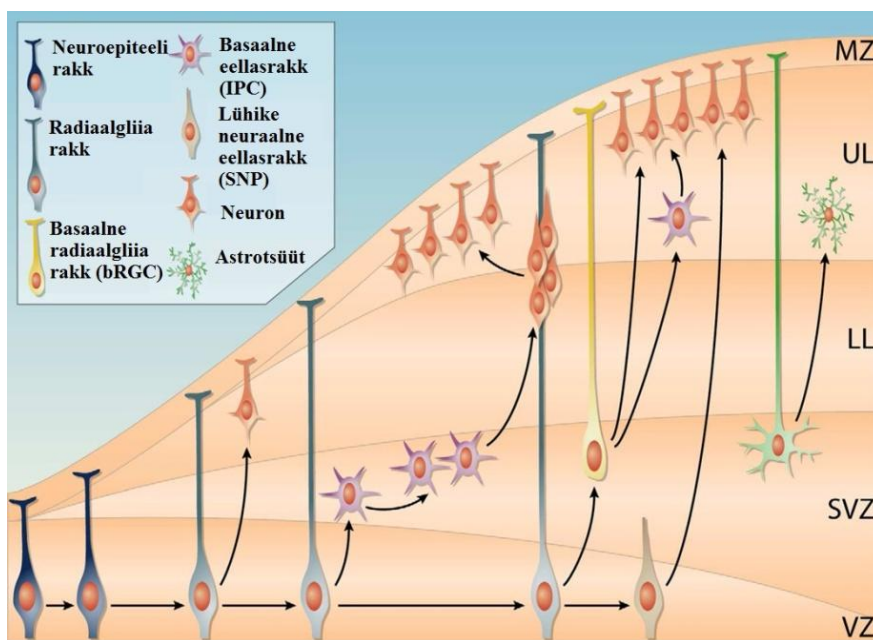
## 1.1. Neurogenees

### 1.1.1. Neuraalsed eellasrakud

Hiire kesknärvisüsteemi (KNS) arengu alguses annavad neuroepiteeli rakud aluse neuraalplaadile, mis neurulatsiooni käigus formeerub neuraalitoruks (Ybot-Gonzalez jt., 2007; Götz ja Huttner, 2005; Franco ja Müller, 2013). Neuroepiteeli rakke peetakse esmasteks eellasrakkudeks, millest saavad alguse kõik ülejäänud KNS eellasrakud ning millest omakorda otsese või kaudse neurogeneesi käigus tekivad neuronid (Huttner ja Kosodo, 2005). Rakud, mis hiljem hõivavad kogu ajukoore, pärinevad kahest olulisest piirkonnast – ventrikulaartsoonist (VZ – *ventricular zone*) ja subventrikulaartsoonist (SVZ – *subventricular zone*) (Noctor jt., 2004). Embrüonaalse ajukoore VZ koosneb ühekihilisest neuroepiteelist (Noctor jt., 2002). Neuroepiteeli näiv kihistumine tuleneb neuroepiteeli rakkudele omasest tuumade interkineetilise migreerumisest, kus tuumad liiguvad rakutsükli edenedes piki apiko-basaalset telge. Rakutsükli G1 faasis migreeruvad tuumad basaalsesse poolde, püsides seal ka S faasi ajal. G2 faasis toimub tuumade liikumine apikaalsesse piirkonda, kus läbitakse mitoos (Chenn ja McConnel, 1995; Götz ja Huttner, 2005).

KNS arengus toimub neurogenees erinevate rakujagunemiste kaudu. Eristatakse kahte põhilist jagunemist: sümmeetriline ja asümmeetriline jagunemine (Chenn ja McConnel, 1995; Noctor jt., 2004). Neurogeneesi alguses, hiire embrüonaalses vanuses E9-E10, toimub neuroepiteeli rakkude üleminek radiaalgliia rakkudeks (Kriegstein ja Götz, 2003). KNS arengus on radiaalgliia laialtlevinud rakutüüp, mille peamiseks funktsiooniks neuraalse eellasrakuna on migreeruvate neuronite juhtimine (Hartfuss jt., 2001; Noctor jt., 2001). Imetaja otsajus omab radiaalgliia bipolaarset morfoloogiat, mille korral üks jätke seondub ventrikulaarse pinnaga ning teine jätke ulatub pehmekelmene (*pia mater*) (Kriegstein ja Götz, 2003). Asümmeetrilise jagunemise käigus VZ-s toodavad radiaalgliia rakud esimesel juhul postmitootilisi neuroneid ja radiaalgliia rakke (otsene neurogenees) ning teisel juhul radiaalgliia rakke ja intermediaalseid ehk basaalseid eellasrakke (IPC – *intermediate precursor cell*), mis migreeruvad SVZ-i. IPC rakud jagunevad SVZ-s omakorda sümmeetriliselt ning produtseerivad neuroneid (kaudne neurogenees) (Noctor jt., 2004; Miyata jt., 2001). Neurogeneesi lõppedes radiaalgliia rakud transformeeruvad astrotsüütideks (Hartfuss jt., 2001). Lisaks radiaalgliia rakkudele esinevad VZ-s ka unikaalse morfoloogiaga lühikesed neuraalsed eellasrakud (SNP – *short neural precursors*). SNP rakud omavad ühendust

ventrikulaarse pinnaga, aga erinevalt radiaalglia rakkudest ei ulatu SNP rakkude jätked basaalse piirkonnani (Gal jt., 2006). Samas on leitud, et kuna IPC rakkudel esineb sarnaseid morfoloogilisi omadusi SNP rakkudega, võib SNP rakkude puhul olla tegemist hoopis IPC raku erivormiga, millel puudub kontakt ventrikulaarse pinnaga (Kowalczyk jt., 2009) (Joonis 1). Basaalsed radiaalglia rakud (bRGC – *basal radial glia cell*) on hiljuti inimese, tuhku, hiire ning marmoseti ajus avastatud kui uut tüüpi iseuuenevad eellasrakud, mis erinevad radiaalglia rakkudest oma jätkete ulatuse poolest. Nimelt omavad bRGC rakud kontakti basaalse piirkonnaga, aga apikaalse alaga side puudub, mistõttu rakukehad asuvad SVZ-i ülemises osas (Fietz jt., 2010, Wang jt., 2011; Shitamukai ja Matsuzaki, 2012; Kelava jt., 2012).



**Joonis 1. Hiire kortikaalne neurogenees.** Ventrikulaatsoonis (VZ) toimub neuroepiteeli rakkude transformeerumine radiaalglia rakkudeks. Radiaalglia rakud jagunevad asümmeetriliselt tekitades iseuuenenud radiaalglia rakke ja kas postmitootilisi neuroneid (otsene neurogenees) või intermediaalseid ehk basaalseid eellasrakke (IPC). Subventrikulaatsoonis (SVZ) IPC rakud jagunevad sümmeetriliselt ja toodavad neuroneid (kaudne neurogenees). Lühikesed basaalsed eellasrakud (SNP) toodavad sümmeetrilise jagunemise käigus neuroneid. Basaalne radiaalglia rakk (bRGC) produtseerib IPC rakke ja neuroneid. Neurogeneesi lõppstaadiumis radiaalglia rakud transformeeruvad astrotsüütideks. MZ – marginaalsoon. UL – ülemised kihid. LL – alumised kihid (modifitseeritud Franco ja Müller, 2013).

### 1.1.2. Neuronite migreerumine ja ajukoore teke

Rakkude migreerumine oma lõplikule positsioonile on väga oluline protsess närvisüsteemi väljakujunemisel. Eesajus eristatakse kahte tüüpi rakkude migratsiooni: radiaalne, kus rakud liiguvad mööda radiaalglia jätkeid VZ-st pehmekesta poole ja tangentsiaalne, mida iseloomustab rakkude liikumine paralleelselt VZ-ga ganglioni kõrgendikult (Marin ja

Rubenstein, 2003). Neuronite liikumine radiaalgliia jätkete abil pehmekelme suunas tagab kuuekihilise ajukoore moodustumise. Postmitoetilised neuronid kasutavad liikumiseks oma lõplikule asukohale kas gliia-juhitud (*glial-guided*) lokomotsiooni või rakukeha ehk sooma (*soma*) translokatsiooni (*somal translocation*) (Nadarajah jt., 2001; Miyata jt., 2001). Sooma translokatsiooni korral on neuroni rakukeha ühenduses pehmekelmega ning esineb pidev kiire liikumine. Gliia-juhitud lokomotsiooni puhul liigub kogu neuron mööda radiaalgliia jätket, kus edasiliikumistele võivad järgneda pikemad seisakud (Nadarajah jt., 2001).

Radiaalse migratsiooni teel moodustunud neuronaalsed kihid tekivad hiirel embrüonaalses vanuses E11-E18. Vanuses E11 koosneb ajukoor paljudest prolifereruvatest eellasrakkudest, mis paiknevad VZ-is (Gupta jt., 2002). Postmitoetilised neuronid, mis liiguvad VZ-st pehmekelme poole moodustavad eelplaadi. Vanuses E13 leiab aset teine migreerumine, kus postmitoetilised rakud liiguvad radiaalselt eemale VZ-st ning jaotavad eelplaadi pindmiseks marginaalsooniks (MZ – *marginal zone*) ning alamplaadiks (SP – *subplate*). Kahe eelneva kihi vahele moodustub kortikaalplaat (CP – *cortical plate*) (Gupta jt., 2002). E14-E18 postmitoetilised neuronid jätkavad VZ-st lahkumist ja liiguvad põiki läbi SP, millele järgneb kortikaalplaadile kihtide moodustumine. Varem tekkinud neuronid moodustavad sisemise kihi ning hiljem tekkinud neuronid paigutuvad välimistesse kihtidesse. Hiljem alamplaat degenerereerub ning alles jääb kuuekihiline ajukoor (Gupta jt., 2002).

## **1.2. Ajukelmed**

### **1.2.1. Ajukelmete üldine iseloomustus**

Ajukelmed koosnevad kolmest sidekoelisest kihist, mis katavad ja kaitsevad selja- ning peaaaju pinda. Sisemine *pia mater* ehk pehmekelme on õhuke kiht vahetult basaalmembraani (BM – *basement membrane*) kohal. Välimine *dura mater* ehk aju kõvakelme on tihe kiuline kiht, mis asetseb vastu koljuõõnt. Kahte eelnevat membraani ühendab *arachnoid* ehk ämblikvõrkkelme (Radakovits jt., 2009; Hecht jt., 2010). Pea arengu käigus kraniaalsed neuraalharja rakud migreeruvad ja diferentseeruvad näoluudeks, ajukelmeteks ning kolju otsmiku-luuks (Zarbalis jt., 2007). Eesaju katvad kelmed pärinevad kraniaalsest neuraalharjast, kesk-, taga- ja seljaaju kelmed aga somaatilisest mesodermist (Etchevers jt., 1999; Jiang jt., 2002; Couly jt., 1992). Hiirel on kõige algelisemad ajukelmete rakud tuvastatavad embrüonaalses vanuses E9-E10. Vanuses E13 tekivad hiire arengus pehmekelme ja ämblikvõrkkelme. Kõige välimine kiht – kõvakelme – ilmub nähtavale vanuses E14 (Siegenthaler ja Pleasure, 2011).

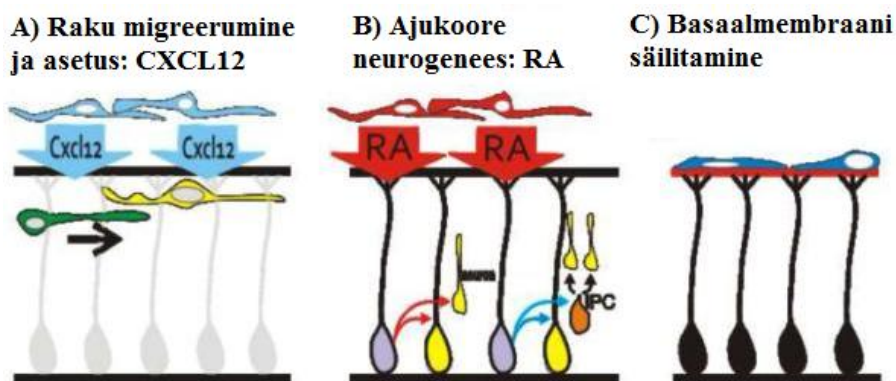
## 1.2.2. Ajukelme funktsioonid aju arengus

Lisaks närvisüsteemi kaitsefunktsioonile toodavad ajukelmed aju arengu jaoks olulisi signaalfaktoreid, nagu näiteks kemokiini ligandi CXCL12 (SDF1), mis reguleerib eesajus Cajal-Retzius' e rakkude ja interneuronite migreerumist, TGF- $\beta$ -d (*transforming growth factor beta*), mis on oluline kolju arengus ning retinoidhapet, mis reguleerib ajukoore neurogeneesi (Borrell ja Marín, 2006; Ito jt., 2003; Siegenthaler jt., 2009). Cajal-Retzius' e rakk on unikaalne rakutüüp MZ-s, mis külgneb vahetult ajukelmetega (Borrell ja Marín, 2006). Cajal-Retzius' e rakud reguleerivad imetaja ajukooses neuronite paiknemist, sekreteerides glükoproteiini Reelin (Ogawa jt., 1995; Halfter jt., 2002), mis omakorda mõjutab radiaalglia arengut ning morfoloogiat (Hartfuss jt., 2003). On näidatud, et ajukelmed juhivad Cajal-Retzius' e rakke MZ-i läbi kemokiini ligandi CXCL12 (SDF1) (Borrell ja Marín, 2006). Mitmed uuringud ajukelmete kohta on läbi viidud *forkhead* perekonna transkriptsioonifaktori *Foxc1* põhjal. *Foxc1* ekspresseerub ajukelmetes juba väga varajases arengus. Hiired, kellel esinevad hüpomorfseid mutatsioonid *Foxc1* geenis (*Foxc1<sup>hih/hih</sup>*), omavad defekte kõigis kolmes ajukelme kihis, mis omakorda põhjustavad tõsiseid kahjustusi nii koljule kui ka ajule (Zarbalis jt., 2007). Mutantsetel *Foxc1<sup>hih/hih</sup>* hiirtel on ajukelmete poolt toodetud signaalfaktori CXCL12 ekspressioon oluliselt vähenenud ning selle tõttu on häiritud interneuronite migreerumine tangentsiaalse migratsiooni tippketkel (E14.5-E18.5) ajukoore dorsaalses osas (Zarbalis jt., 2012) (Joonis 2A).

Ajukelmed produtseerivad vitamiin A metaboolset produkti retinoidhapet, mis seostub spetsiifilistele tuuma retseptoritele ning reguleerib geeni transkriptsiooni (Zhang jt., 2003). Retinoidhappel on oluline funktsioon närvisüsteemi arengu mitmetes protsessides, nagu näiteks neuraaloru sulgumises ja neuronaalses diferentseerumises (Niederreither jt., 1999; Siegenthaler jt., 2009). *Foxc1<sup>hih/hih</sup>* mutantsetel hiirtel retinoidhapet eesajus ei leidu ning sellest tulenevalt on vähenenud nii neuronite kui ka IPC rakkude produktsioon (Siegenthaler jt., 2009). Samuti on retinoidhape oluline tagaaju anteriorse osa arenguks (Zhang jt., 2003) (Joonis 2B).

Mitmed uurimustööd on näidanud ajukelme olulisust ka BM-i säilitamises (Li jt., 2008; Hecht jt., 2010; Zarbalis jt., 2007). BM on õhuke rakuvaheaine ehk ekstratsellulaarse matriksi (ECM – *extracellular matrix*) kiht, mille põhilisi komponente – laminiini, nidogeeni ja kollageen IV – toodavad ajukelme fibroblastid (Erickson ja Couchmann, 2000; Li jt., 2008). Iga BM-i komponent mängib olulist rolli rakkude kasvus, diferentseerumises, adhesioonis ning migratsioonis (Erickson ja Couchmann, 2000). Aju arengus leidub BM-i ajukoore peal asetsevas pehmekelmes ja veresoonte ümbruses. On leitud, et BM-i ja rakk-

ECM kontakti vahendavate valkude eemaldamine võib viia tõsiste ajuhäireteni (Siegenthaler ja Pleasure, 2011; Beggs jt., 2003; Halfter jt., 2002). Hiirtel, kellel laminiin  $\gamma 1$  ahelas oli deleteeritud nidogeeni siduv molekul  $\gamma 1 III 4$ , esines otsaju BM-is katkeid, samal ajal kui metsiktüüpi (*wild-type*) embrüotel oli BM terviklik (Halfter jt., 2002) (Joonis 2C). Vaheaju BM-is katkeid ei esinenud nii mutantsetel kui ka *wt* hiirtel (Halfter jt., 2002). Sarnaseid katkeid BM-is on leitud ka eelnevalt mainitud *Foxc1<sup>hih/hih</sup>* embrüotel alates vanusest E18.5 (Zarbališ jt., 2007). BM on barjääriks migreeruvatele rakkudele ja oluliseks kinnituskohaks radiaalglia rakkude jätketele (Halfter jt., 2002; Zarbališ jt., 2007) (Joonis 2C). Radiaalglia rakkude jätkete tagasitõmbumine viib neuraalsete eellasrakkude hävimiseni ning järk-järgult neuronite arvu vähenemiseni ajukooses (Radakovits jt., 2009).



**Joonis 2. Ajukelme peamised funktsioonid aju arengus.** A) Ajukelmed reguleerivad kemokiini CXCL12 kaudu Cajal-Retziuse rakkude migreerumist õigestesse positsioonidesse B) Ajukelme poolt toodetud retinoidhape võimaldab ajukooses neuraalsetel eellasrakkudel toota neuroneid kas otsese (vasakul) või kaudse (paremal) neurogeneesi abil, läbi basaalsete eellasrakkude (IPC). C) Pehmekelme fibroblastid (sinised) säilitavad basaalembraani (BM) (punane), mis on oluline kinnitumiskoht gliirakkudele (modifitseeritud Siegenthaler ja Pleasure, 2011).

### 1.3. Guaniini nukleotiidivahetusfaktor RIC8

#### 1.3.1. RIC8 üldine iseloomustus

RIC8 (*resistant to inhibitors of cholinesterase*) on 63kD suurune tsütoplasmaatiline valk, mis avastati esmakordselt ümarussis *Caenorhabditis elegans* geneetiliste analüüside tulemusena (Miller jt., 1996; Miller jt., 2000). RIC8 valku guaniini nukleotiidivahetusfaktorina (GEF-*guanine nucleotide exchange factor*) on uuritud mitmetel organismidel. Katseid on läbi viidud näiteks äädikakärbsega (*Drosophila melanogaster*) (David jt., 2005), ümarussiga (*Caenorhabditis elegans*) (Miller jt., 1996), kannuskonnaga (*Xenopus laevis*) (Romo jt., 2008), koduhiirega (*Mus musculus*) (Tõnissoo jt., 2003), sebrakalaga (*Danio rerio*) (Nagayoshi jt., 2008), rändrotiga (*Rattus norvegicus*) (Thomas jt., 2008), amööbiga

(*Dictyostelium discoideum*) (Kataria jt., 2013) ja limaseentega (*Neurospora Crassa*) (Wright jt., 2011). Selgrootud, nagu *C.elegans* ja äädikakärbes *Drosophila melanogaster*, sisaldavad ühte RIC8 valku, imetajatel ja sebrakalal aga esineb kaks homoloogi: RIC8A ja RIC8B (Nagayoshi jt., 2008; Tall jt., 2003). Kahest RIC8 valgust ainult RIC8A toimib GEF-ina  $G\alpha_q$ ,  $G\alpha_i$ ,  $G\alpha_o$ ,  $G\alpha_{12}$  ja  $G\alpha_{13}$  valkudele. RIC8B seostub  $G\alpha_q$  ja  $G\alpha_s$  valkudega (Tall jt., 2003). RIC8 valgu struktuur koosneb 10-st armadillo domäänist (Figuroa jt., 2009). Armadillo järjestusi sisaldavad valgud on võimelised seostuma teiste valkudega ning seeläbi mõjutavad mitmeid olulisi bioloogilisi protsesse (Figuroa jt., 2009). Varasemalt peeti RIC8 peamisteks rollideks erinevates bioloogilistes protsessides G-valkude poolt vahendatud sünaptilise signaaliülekanne regulatsiooni närvisüsteemis ja osalemist mitoosikävi orientatsiooni kujunemisel rakkude asümmeetrilisel/sümmeetrilisel jagunemisel embrüogeneesis. Nendest võtmeprotsessidest lähtuvalt on RIC8 puhul kasutatud ka paralleelnimetust SYNEMBRYN (Miller jt., 2000; Miller ja Rand, 2000). Praeguseks on RIC8 bioloogiliste funktsioonidena lisandunud veel osalemine rakkude adhesioonis, migratsioonis ja gastrulatsiooni protsessides (Ma jt., 2012; Fuentealba jt., 2013; Tõnissoo jt., 2010)

### **1.3.2. Heterotrimeersed G-valgud**

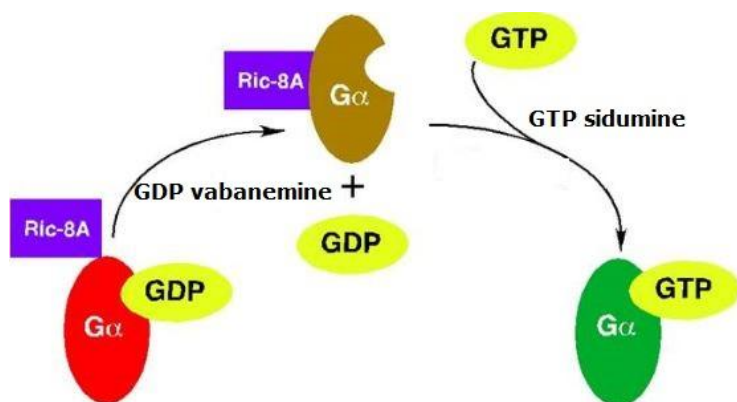
Heterotrimeersed G-valgud on membraanseoselised valgud, mis on olulised signaalide ülekandes rakuvälisest keskkonnast raku läbi G-valkudega seotud retseptorite (GPCR- *G protein coupled receptor*) (Tall jt., 2003). Heterotrimeersed G-valgud koosnevad  $\alpha$ ,  $\beta$  ja  $\gamma$  subühikutest. Inaktiivses vormis on  $G\alpha\beta\gamma$  seotud seitse korda membraani läbiva retseptoriga (GPCR) ning  $G\alpha$  subühik guanosiin-difosfaadiga (GDP) (Bastiani ja Mendel, 2006). Peale aktivatsiooni ligandiga läbib GPCR mitmeid konformatsioonilisi muutusi käitudes GEF-ina, mille tulemusena vahetatakse GDP guanosiin-trifosfaadi (GTP) vastu (Tall jt., 2003). Seejärel aktiveerunud GTP- $G\alpha$ -kompleks laguneb GTP- $G\alpha$  ning  $G\beta\gamma$  dimeeriks, mis on võimelised interakteeruma edasiste efektormolekulidega. GTP- $G\alpha$  hüdroolüüsib GDP- $G\alpha$ -ks, mis omakorda seondub  $G\beta\gamma$ -ga ning taastub uuesti inaktiivne heterotrimeerne GDP- $G\alpha$ / $G\beta\gamma$  kompleks (Bastiani ja Mendel, 2006; Tall jt., 2003).

### **1.3.3. RIC8 biokeemiline funktsioon**

GEF RIC8 seostub inaktiivse GDP- $G\alpha$  kompleksiga soodustades sel viisil GDP vabanemist ning stabiilse nukleotiidivaba  $G\alpha$ -RIC8 moodustumist. Seejärel toimub GTP ühinemine  $G\alpha$ -RIC8 kompleksiga, mis vabastab RIC8 ja taas aktiveeritud G-valgu. Nukleotiidivaba  $G\alpha$  seondumisega RIC8 pikendab ja võimendab G-valgu signaali (Tall jt., 2003) (Joonis 3).

RIC8 üheks biokeemiliseks funktsiooniks on ka G-valkude biosüntees. RIC8 kontrollib rakus G-valkude hulka, käitudes kui molekulaarne tšaperon, mis vahendab  $G\alpha$  subühiku seondumist intratsellulaarse membraaniga (Gabay jt., 2011).  $G\alpha$  subühiku ahelad, mis sünteesitakse ribosoomides, ei ole võimelised seonduma guaniini nukleotiidiga seni, kuni nad voltuvad korralikult ning moodustavad guaniini nukleotiidi seondumistasku (Gabay jt., 2011). RIC8 seondumine ribosoomil tekkiva  $G\alpha$  subühikuga võib aidata kaasa  $G\alpha$  subühiku ahelate voltumisele ning seega  $G\alpha$  subühiku seondumisele plasmamembraaniga (Gabay jt., 2011; Chan jt., 2013). Lisaks, võrreldes metsiktüüpi (*wild-type*) rakkudega, on *Ric8<sup>-/-</sup>* ES (*embryonic stem cells*) rakkudes  $G\alpha_i$ ,  $G\alpha_q$  ning  $G\beta$  valgud degradeerunud (Gabay jt., 2011).

RIC8 interaktsiooni on täheldatud ka RGS (*regulators of G protein signaling*) perekonna valkudega. RGS14 on GTPaasi aktiveeriv valk (GAP- *GTPase activating protein*), mis lühendab G-valkude poolt edastatavat signaali (Vellano., jt 2011). RIC8 seondub RGS14: $G\alpha_{i1}$  kompleksiga, et reguleerida selle aktivatsiooni. Nukleotiidi puudumise korral RIC8 stimuleerib  $G\alpha_{i1}$  vabanemist RGS14 küljest, et saavutada stabiilne RIC8: $G\alpha_{i1}$  kompleks. GTP $\gamma$ S juuresolekul RIC8 indutseeritud RGS14: $G\alpha_{i1}$  vabanemine võimaldab RIC8 käituda kui nukleotiidivahetusfaktor  $G\alpha_{i1}$  subühikule, millele järgneb kiire RIC8: $G\alpha_{i1}$  lahtiühendamine ning vaba  $G\alpha_{i1}$ -GTP $\gamma$ S kompleksi moodustumine (Vellano jt., 2011).



**Joonis 3. Nukleotiidivahetusfaktor RIC8.** RIC8 seondub  $G\alpha$  subühikuga, mis on omakorda seotud GDP-ga. GDP vabaneb ja moodustub stabiilne nukleotiidivaba  $G\alpha$ -RIC8 kompleks. GTP lõhub  $G\alpha$ -ga seondudes kompleksi, mille tagajärjel RIC8 ja aktiveeritud  $G\alpha$  valk vabanevad. (Modifitseeritud Tall jt., 2003 järgi).

#### 1.3.4. RIC8 funktsioon närvisüsteemis

RIC8 valku on uuritud mitmetel organismidel. *C.elegans*-il ekspresseerub RIC8 närvisüsteemi kõhtmises närvitorus ja peaganglionis ning RIC8 funktsiooni mahasurumine põhjustab *C.elegans*-il probleeme liikumisel, keha painutamise võimel ning munemisel (Miller jt., 2000). RIC8 valgu oluline mõju *C.elegans*-i närvisüsteemi signaalvõrgustikus on seotud sünaptilise ülekande kontrolliga  $G\alpha_q/G\alpha_o$  signaalirajas, mis reguleerib intratsellulaarseid

diatsüülglütserooli (DAG – *diacyl-glycerol*) kontsentratsioone ning omakorda põhjustab neurotransmitterite sekretsiooni (Miller jt., 2000).

RIC8 rolli närvisüsteemis on uuritud ka hiirel. Hiire närvisüsteemi varajases arengus ekspresseerub RIC8 kranaalgauglionites, sümpaatilises tüves, neuraalorus, kõrvas ning vomeronasaalorganis (Tõnissoo jt., 2003). Täiskasvanud hiirel esineb RIC8 mitmetes olulistes ajupiirkondades, nagu näiteks neokorteksis, hipokampuses, vöökäärus, käbikehas ning väikeajus (Tõnissoo jt., 2003). Homosügootsed *Ric8<sup>-/-</sup>* hiired pole piisavalt elujõulised ning surevad gastrulatsiooni käigus. Erinevad käitumiskatsed on näidanud, et haplodefitsiitsetel *Ric8<sup>+/-</sup>* hiirtel esinevad ärevushäired, vähenenud ruumiline tajus ja õppimisvõime (Tõnissoo jt., 2006). Hiljuti on näidatud, et *Ric8* väljalülitamine postmitootilistest neuronitest põhjustab hiirtel sünnijärgselt mitmesuguseid neurospetsiifilisi häireid nagu koordinatsiooni ja tasakaaluhäireid, lokomotoorset hüpoaktiivsust, lihasnõrkust, tõmbelusi, krampe ning hiirte postnataalset letaalsust vanusevahemikus P0-P6 (Ruisu jt., 2013).

Lisaks on näidatud, et RIC8A ning RIC8B ekspresseeruvad hiire maitsepunga rakkudes (Fenech jt., 2009). Enamik nendest rakkudest sisaldavad IP3R-3, mis on oluline mõru ja magusa maitse retseptor. RIC8A interakteerub *Gα-gustducin* ja *Gα<sub>i2</sub>*-ga, mille kaudu võimendatakse signaali mõru maitse retseptorilt hTas2R16 (Fenech jt., 2009).

RIC-8B rolli on täheldatud hiire haistmiskompleksis. RIC-8B ekspresseerub sarnaselt haisteretseptorite spetsiifilise valguga *G<sub>olf</sub>* täiskasvanud hiire haistneuronites. RIC-8B seostub *G<sub>olf</sub>*-ga, mis aktiveerib adenüül III, et toota tsüklilist adenosin monofosfaati (cAMP – *cyclic adenosine monophosphate*). Suurenenud cAMP tase aktiveerib tsüklilised nukleotiidi vahendatud kanalid, põhjustades raku membraani depolariseerumise (Von Dannecker jt., 2005).

### **1.3.5. RIC8 funktsioon adhesioonis ja migratsioonis**

Viimaste aastate jooksul on hakatud uurima RIC8 rolli ka adhesiooni- ja migratsiooniprotsessides. Üheks uurimisteenaks on olnud RIC8 roll väikeaju arengus, kus RIC8 on laialdaselt ekspresseerunud (Tõnissoo jt., 2003). Väikeaju koor koosneb järgmistest kihtidest: molekulaarkiit, ganglionaar- ehk Purkinje rakkude kiit ning sõmer (granuloos)-kiit (Hussar jt., 2005). Selline kihistumine kujuneb välja, kui granulaarsete rakkude eellasrakud migreeruvad välimisest kihist sisemisse kihti (Sillitoe ja Joyner, 2007). Põhjalikumalt on uuritud väikeajus Bergmann'i gliia adhesiooni BM-ile (Ma jt., 2012). Bergmann'i gliia on väikeajus paiknev astrotsüüt, mille rakukeha ehk sooma asub Purkinje rakkude kihis ning jätked ulatuvad molekulaarkihti (Yamada ja Watanabe, 2002). Hiljutised

uuringud on näidanud, et *Ric8*<sup>-/-</sup> mutantsete hiirte puhul puudus Bergmann'i gliia rakkudel korrapärane asetus, samal ajal kui kontroll-hiirtel eristus selgelt organiseeritud kiht (Ma jt., 2012). Samuti polnud *Ric8*<sup>-/-</sup> hiirte gliiarakud võimelised edukalt kinnituma Laminiinile, BM-i põhilisele valgule (Ma jt., 2012). *Ric8* väljalülitamine põhjustab häireid granulaarsete ja Purkinje rakkude migratsioonis ning selle tõttu on takistatud ka väikeaju kihtide väljakujunemine (Ma jt., 2012). Seega on GEF RIC8 väga oluline Bergmann-gliia ja BM-i adhesioonis, eriti just väikeaju kihtide moodustumise algusjärgus (Ma jt., 2012).

RIC8 rolli neuraalharja rakkude migratsioonis on uuritud kannuskonnal (*Xenopus laevis*) (Fuentealba jt., 2013). Neuraalharja rakud migreeruvad järkjärgult erinevatesse piirkondadesse ning osalevad perifeerse närvisüsteemi neuronite ja gliiarakkude, näo piirkonna luu-, kõhr- ja sidekoe ning melanotsüütide moodustumises (Fuentealba jt., 2013). Selleks, et neuraalharja rakud rändaksid õigetesse asukohtadesse, on vajalik õiget interaktsiooni signaaliradadega. Kannuskonnadel, kellel RIC8 funktsioon oli maha surutud, puudus migreeruvatel rakkudel kindel suund, samal ajal kui funktsionaalse RIC8 olemasolul rändasid rakud SDF1 (*stromal cell-derived factor*) poole, mis on põhiline kemoatraktant kraniaalsete neuraalharja rakkude liikumiseks õigetesse positsioonidesse (Fuentealba jt., 2013; Belmadani jt., 2005). RIC8 puudumise korral oli tulemuseks ebaregulaarne rakkude migreerumine, sealhulgas rakkude liikumise ja fokaalse adhesiooni vähenemine (Fuentealba jt., 2013).

Eelnevalt on näidatud, et heterotrimeersete G-valkude komponent  $G\alpha_{13}$  on oluline tsütoskeleti ümberkorraldustes (Wang jt., 2011).  $G\alpha_{13}$  vahendatud protsessid, nagu näiteks dorsaalsete kurdude teke hiire embrüonaalsetel fibroblastidel ning rakkude migratsioon, sõltuvad kasvufaktorite seondumisest retseptor-türosiinkinaasile (RTK – *receptor tyrosine kinases*). Vastusena PDGF (*platelet-derived growth factor*) kasvufaktori signaalile seondub RIC8  $G\alpha_{13}$ -ga ning aktiveerib selle, mis omakorda mõjutab dorsaalsete rakkude tekke dünaamikat ning rakkude migratsiooni (Wang jt., 2011).

Hiljuti on näidatud ka RIC8 interaktsiooni neuraalsete rakkude adhesiooni molekuliga (NCAM – *neural cell adhesion molecule*) (Amoureux jt., 2012). NCAM osaleb mitmetes rakk-rakk interaktsioonides, mis on olulised närvisüsteemi arengus (Crossin ja Krushel, 2000; Rougon ja Hobert, 2003). NCAM-il esineb mitmeid isovorme, kuid RIC8 seondumist on kirjeldatud ainult NCAM180-ga. RIC8, NCAM180 ning  $G\alpha_s$  subühik moodustavad molekulaarse kolmikkompleksi ning NCAM180 on võimeline tugevdama  $\beta$ -adrenergilist vastust ainult RIC8 olemasolul (Amoureux jt., 2012).

## 2. EKSPERIMENTAALNE TÖÖ

### 2.1. Töö eesmärgid

1. Iseloomustada *NestinCre;Ric8<sup>lacZ/lox</sup>* embrüote ning nende kontroll-pesakonnakaaslaste ots- ja keskaju histogeneesi erinevatel arenguetappidel (E14.5 ja P0).
2. Kirjeldada ning võrrelda *NestinCre;Ric8<sup>lacZ/lox</sup>* embrüote ning nende kontroll-pesakonnakaaslaste ajukelme basaalmembraani (BM) terviklikkust arenguetappidel E12.5, E14.5 ja P0.

### 2.2. Materjal ja meetodika

#### 2.2.1. Töös kasutatud hiireliinid

Neurospetsiifilise *NestinCre;Ric8<sup>lacZ/lox</sup>* konditsionaalse hiireliini tekitamiseks kasutati järgmisi hiireliine:

1. *NestinCre* – transgeenne hiireliin, kus Cre-rekombinaasi ekspressioon on hiire Nestin promootori kontrolli all.
2. *RIC8<sup>lox/lox</sup>* – transgeenne hiireliin, kus loxP järjestuste vahele on asetatud märklaudeen *Ric8*, mille tunneb ära koospetsiifiline Cre-rekombinaas.
3. *Ric8<sup>lacZ/+</sup>* – lacZ knock-in hiireliin, kus *Ric8* lookusesse on viidud reportergeen *lacZ*, millelt sünteesitava  $\beta$ -galaktosidaasi ekspressioon jäljendab RIC8 ekspressiooni.

Bakalaureusetöös kasutati katseloomi vastavalt Euroopa Liidus kehtestatud eeskirjadele. Loomadega tegelesid ja ohverdasid vastavalt EL direktiivile 2010/63/EL koolituse läbinud ja loomkatse luba omavad isikud. Antud projekt on kooskõlastatud Eesti Põllumajandusministeeriumi loaga nr. 09 03956. Kõiki eksperimendis kasutatud hiiri hoiti standardsetes laboritingimustes, kus neile tagati ööpäevaringne vabalt kättesaadav söök ja jook.

#### 2.2.2. Embrüote dissekteerimine

Antud töös kasutatud hiired olid embrüonaalses vanuses E12.5, E14.5 ning postnataalses vanuses P0. Embrüote vanuseks E0.5 märgiti päev, mil peale kopulatsiooni detekteeriti emahiirel vaginaalne limakork. Lisaks hinnati embrüote vanust ka morfoloogiliste parameetrite järgi.

Embrüod (E12.5, E14.5) dissekteeriti emakasarvedest külmas PBS-s. Embrüotelt eemaldati ekstraembrüonaalsed kestad (amnion, rebukott) ning võeti rebukotist koetükk genotüpiseerimiseks, seejärel fikseeriti 4 % PFA-ga. Vastsündinud ohverdatud loomad (P0) dekapiteeriti ning peapiirkond fikseeriti 4% PFA-ga (paraformaldehüüd), genotüpiseerimiseks võeti saba otsast tükike kudet.

### 2.2.3. Embrüote genotüpiseerimine

Embrüote genotüübi määramiseks kasutati dissekteerimisel eraldatud saba või rebukoti koematerjali. Koematerjal asetati 60 µl lüüsilahusesse, mis koosnes järgmistest komponentidest: destilleeritud vesi (ddH<sub>2</sub>O), 10x lüüsipuhver (180 mM Tris-HCl (pH 9.0); 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0.02% Tween 20) ning proteinaas K (187 ng/µl). Koematerjal inkubeeriti 56°C juures üleöö ning inkaktiveeriti järgmisel päeval 20 minutit 96°C juures. Lüüsilahust tsentrifugeeriti lüüsumatu osa eraldamiseks maksimumpööretel 13000 p/min 10 minutit (Biofuge pico). Seejärel kasutati genoomset materjali alleel-spetsiifilise polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR) läbiviimiseks.

PCR reaktsioonisegu kogumaht 10 µl sisaldas järgmisi komponente: 1x(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> puhver (Solis bioDyne), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (Solis bioDyne), 0,2 mM dNTP, praimerid 0,25 µM, Taq polümeraas 0,02 U/µl, 1 µl märklaud DNA ja ddH<sub>2</sub>O. PCR viidi läbi masinal (Biometra TProfessional Thermocycler).

Töös kasutatud alleel-spetsiifilised praimerid:

Genotüüp: *Ric8<sup>lox/lox</sup>*

RicCregenof 5'-GGTAGGGCTCAATGTTGG-3'

RicCregenor 5'-GCCAAACAATCTCTCGAACC-3'

Genotüüp: *Ric8<sup>lacZ+</sup>*

LacZ300 5'-CGCATCGTAACCGTGCATCT-3'

RicPTGgenof 5'-CTCTCCCAGCATCCCCTCAC-3'

PTG(ric8)in1rev 5'-CACACCCCAGCCGAGTTG-3'

Genotüüp: *NestinCre*

Nestin3 5' - CCTCCATCCCAGACAAATACATTA - 3'

Nestin5 5' - CTTGGCTTTGTACTTTCTGTGACT - 3'

PCR reaktsiooni tingimused:

95°C 5 minutit

95°C 30 sekundit }  
58°C 40 sekundit } 32 tsüklit  
72°C 1 minut }

72°C 10 minutit

4°C paus

Amplifitseeritud genoomse DNA produktide suurus määrati agarosgeelelektroforeesil. Proovid kanti 1% või 1,5% TAE (Tris-atsetaat-EDTA) agarosgeelile, kuhu eelnevalt oli lisatud 5 µl etiidiumbromiidi ning pikkusmarkerina kasutati 1kb DNA Ladder'it (Fermentas).

#### **2.2.4. Parafiinlõikude valmistamine**

Immunohistokeemilise analüüsi teostamiseks sisestati hiire embrüod parafiini. Embrüod fikseeriti eelnevalt 4% PFA/PBS lahuses 1 tund ja seejärel pesti 3x15 minutit PBS-is. Pesemisele järgnes dehüdreerimine tõusva kontsentratsiooniga alkoholi lahustes (50%, 60%, 70%, 80%, 90% ning 2 korda 100%-line etanool) 4°C juures 24 tundi igas lahuses. Järgnevalt immutati embrüoid ksülooliga 2x2 tundi, mille järel asetati need 100%-lisse parafiini ning inkubeeriti 1 tund 60°C juures. Puhta parafiiniga inkubeerimist korrati veel 2 tundi. Seejärel pandi embrüod puhta parafiiniga vormidesse, mida eelnevalt määrati glütserooliga. Parafiinblokid asetati külmpaadile jahtuma ning säilitati kuni lõikamiseni 4°C juures.

Parafiinblokkidest lõigati mikrotroomiga Microm HM355S embrüotest/peast 8 µm frontaallõigud. Lõigud asetati *SuperFrost Plus* alusklaasidele (Menzel-Gläser) ja lasti kinnituda ja kuivada 24 tundi 37°C juures ning seejärel säilitati 4°C juures külmkapis.

#### **2.2.5. Külmlõikude valmistamine**

Fikseeritud P0 vastsündinute peapiirkonda pesti 3x PBS-is ning seejärel asetati 30% sahharoosilahusesse (sahharoos + PBS) ligikaudu 3 ööpäevaks 4°C juurde. Pead säilitati edasiseks tööks -80°C juures. Seejärel lõigati neist -23°C juures krüomikrotroomiga (Microm HM-560) 20 µm koronaallõigud. Peade kinnitumiseks lõikamisalusele kasutati *Tissue freezing* geeli (Jung). Koelõigud asetati *SuperFrost Plus* alusklaasidele (Menzel-Gläser). Järgnevalt toimus immunohistokeemiliste preparaate valmistamine.

### **2.2.6. Histoloogiliste preparaate valmistamine**

Histoloogiliste preparaate valmistamiseks teostati hematoksüliin-eosiin (HE) värving. Preparaate hoiti 30 minutit 60°C juures lõikude tugevamaks kinnitumiseks. Seejärel deparafiniseeriti koelõike 3x5 minutit ksülooliga. Koelõikude rehüdreerimine toimus langeva kontsentratsiooniga alkoholilahustes, 2 minutit igas lahuses (100%; 96%; 80%; 70% ning 50%-line etanool). Järgnevalt pesti koelõike ddH<sub>2</sub>O-ga 1 minut. Tuumad värviti esmalt hematoksüliiniga 10 minutit, millele järgnes pesu ning fikseerimine kraanivees. Tsütoplasma värviti eosiiniga 1-2 minutit, värv loputati ning fikseeriti kraanivees 10 minutit. Seejärel toimus veetustamine 2x tõusva kontsentratsiooniga etanooli lahustes (70%; 96% ja 100% etanooli lahus) ning 2x2 minutit ksüloolis. Värvitud koelõigud sulundati sulundamisvedelikuga Pertex ning peale asetati ettevaatlikult katteklaas.

### **2.2.7. Immunohistokeemiline analüüs parafiinlõikudele**

Laminiin-1 ja RIC8 lokalisatsiooni uurimiseks teostati koelõikudele immuunohistokeemiline analüüs. Esmalt asetati parafiinlõikudega klaasid 30 minutiks 60°C juurde, et lõigud tugevamalt kinnituks. Koelõike deparafiniseeriti ksülooliga 2x5 minutit. Sellele järgnes koelõikude rehüdreerimine langeva kontsentratsiooniga alkoholilahustes. Alustati kõige tugevama kontsentratsiooniga 100% etanooli lahusest, mida hoiti peal 2x3 minutit. Seejärel leotati lõike 96%, 90%, 80%, 70% ja 50% etanoolis 2 minutit ning pesti ddH<sub>2</sub>O-ga. Alusklaase kuumutati 30 minutit naatriumsitraatpuhvril (10mM, pH=6,0) 96°C juures. Pärast 20 minutit jahtumist permeabiliseeriti lõike 0,1% TritonX/PBS lahuses. Immunoglobuliini mittespetsiifilise seondumise vältimiseks blokeeriti koelõike 1 tund kitseseerumiga (5% kitseseerum; 1% BSA/PBT (PBS + 0,02% Tween20)). Seejärel inkubeeriti preparaate üleöö niisutuskambris 4°C juures järgmiste primaarsete antikehadega: BM-i märkimiseks Laminiin-1 vastane küülikus valmistatud polükloonaalne antikehaga (lahjendus 1:500) (Sigma-Aldrich) ning RIC8 vastane hiires valmistatud monokloonaalne antikeha (lahjendus 1:70) (Abcam). Negatiivsele kontrollõigule primaarset antikeha ei pandud.

Järgmisel päeval pesti klaase 3x5 minutit PBT lahusega ja inkubeeriti sekundaarsete antikehadega Alexa 555 *goat-anti-rabbit* (1:600) ning Alexa 488 *goat-anti-mouse* (1:600) 1 tund 4°C juures pimendatud niisutuskambris. Seejärel pesti klaase 1x5 minutit PBT lahusega ning 2x5 minutit PBS lahusega. DNA visualiseerimiseks lisati pesulahusele DAPI reagenti (lahjendus 1:1000). Järgnevalt pesti alusklaasid uuesti 2x5 minutit PBS-ga. Lõpetuseks sulundati koelõigud Floromount geeliga (Electron Microscopy Sciences) ja asetati

ettevaatlikult peale katteklaas. Kuivamise vältimiseks lakiti katteklaasi ääred läbipaistva lakiga.

### **2.2.8. Immunohistokeemiline analüüs külmlõikudele**

Külmlõikudega klaase soojendati 30 minutit toatemperatuuril. Koelõike pesti ddH<sub>2</sub>O-ga 5 minutit ning seejärel PBS-ga 5 minutit. Pesule järgnes permeabiliseerimine 0,1% Triton-X/PBS lahuses 20 minutit. Immunoglobuliini mittespetsiifilise seondumise vältimiseks blokeeriti lõike 1 tund kitseseerumiga niisutuskambris (5% kitseseerum; 1% BSA/PBT (PBS; 0,02% Tween20)). Peale blokeerimist inkubeeriti koelõike primaarse antikehaga 1,5 tundi toatemperatuuril, milleks kasutati BM-i märkimiseks Laminiin-1 vastast küülikus valmistatud polükloonaalset antikeha (lahjendus 1:500) (Sigma-Aldrich). Seejärel teostati 3x10 minutit pesu PBT-ga (PBS + 0.02% Tween20), millele järgnes inkubeerimine sekundaarse antikehaga (Alexa 555 *goat-anti-rabbit*) 1 tund. Järgnevalt pesti 2x10 minutit PBT-ga ning 2x5 minutit PBS-ga. Tuumade värvimiseks kasutati DAPI reagenti (lahjendus 1:1000). Koelõigud pesti 1x PBS-ga ning sulundati Floromount geeliga (Electron Microscopy Sciences). Lõpetuseks asetati ettevaatlikult peale katteklaas ning kuivamise vältimiseks lakiti ääred läbipaistva lakiga.

### **2.2.9. Koelõikude pildistamine**

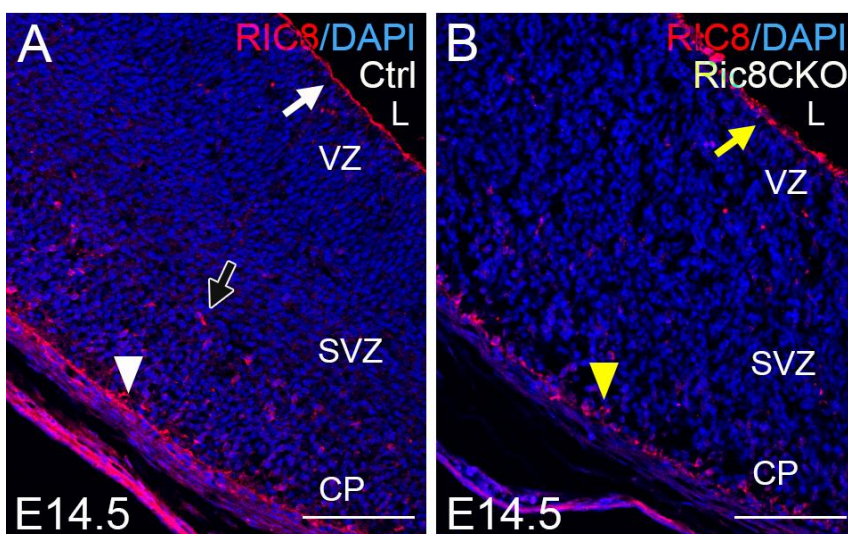
Kõiki immunohistokeemiliselt töödeldud koelõike pildistati konfokaalmikroskoobiga Olympus Fluoroview<sup>TM</sup> FV 1000. Histoloogiliste piltide analüüsimises kasutati Olympus DP71 kaamerat. Piltide töötlemiseks kasutati arvutiprogrammi Adobe Photoshop CS6.

## 2.3. Tulemused

Antud bakalaureuse töös võrreldi neurospetsiifiliste *Ric8* konditsionaalsete mutantide *NestinCre;Ric8<sup>lacZ/lox</sup>* (edaspidi *NestinRIC8<sup>-/-</sup>*) ning kontroll-pesakonnakaaslaste ots- ja keskaju hiire embrüonaalses vanuses E12.5, E14.5 ning postnataalses vanuses P0.

### 2.3.1. RIC8 lokalisatsiooni uurimine otsajus

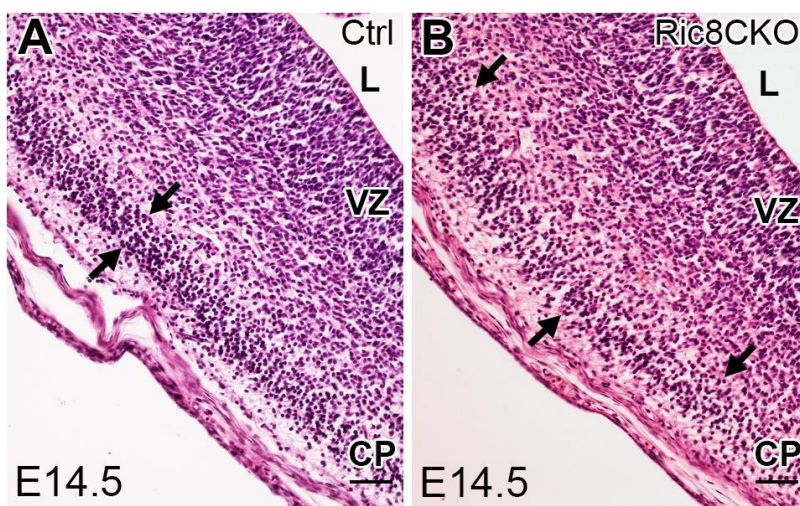
Embrüonaalses vanuses E14.5, mis on neurogeneesi tippfaasiks, teostati RIC8 ekspressiooni uurimiseks peaju koronaallõikudele immunohistokeemiline analüüs. *NestinRic8<sup>-/-</sup>* hiirte peaju frontaallõikude analüüsil võrdluses kontroll-pesakonnakaaslastega selgus, et peamised erinevused ilmnisid otsajukoore basaalsemas piirkonnas. Kontroll-hiires paiknes RIC8 otsajukoore ventrikulaartsoonis (VZ) apikaalsemas osas (Joonis 4A; valge nool). Lisaks oli RIC8 täheldatav hajusamalt ka subventrikulaartsoonis (SVZ) (Joonis 4A; must nool) ja eristatavalt kortikaalplaadis (CP) (Joonis 4A; valge nooleots). *NestinRic8<sup>-/-</sup>* hiirtel oli samades ajupiirkondades RIC8 ekspressiooni tase märgatavalt vähenenud, lokalisatsiooni muster katkendlik või täielikult kadunud (Joonis 4B; kollane nool ja nooleots).



**Joonis 4. RIC8 lokalisatsioon E14.5 hiire embrüo otsajus.** (A) Kontroll-embrüo (Ctrl) ja (B) *NestinRic8<sup>-/-</sup>* embrüo (*Ric8CKO*, *Ric8 conditional knockout*) ajukoore RIC8 (punane) immunofluorestsentsanalüüs frontaallõikudel. DNA on visualiseeritud DAPI-ga (sinine). (A) Valge nool näitab RIC8 lokalisatsiooni ventrikulaartsoonis (VZ) apikaalsemas osas. Must nool näitab RIC8 lokalisatsiooni subventrikulaartsoonis (SVZ). Valge nooleots näitab RIC8 lokalisatsiooni kortikaalplaadis (CP). (B) Kollane nool viitab katkendlikule RIC8 lokalisatsioonile VZ apikaalsemas osas. Kollane nooleots viitab katkendlikule RIC8 lokalisatsioonile CP-s. Lühendid: CP, kortikaalplaat; L, vatsakese luumen; SVZ, subventrikulaartsoon; VZ, ventrikulaartsoon. Mõõtkava: 100  $\mu$ m.

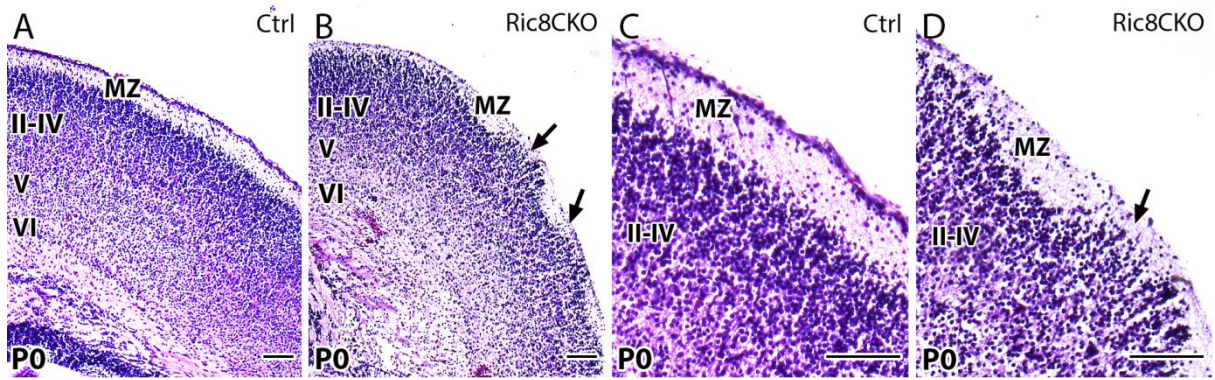
### 2.3.2. Otsaju korteksi histoloogiline analüüs

Iseloomustamiseks võimalikke defekte *NestinRic8<sup>-/-</sup>* hiirte otsajukoore arengus, keskenduti E14.5 embrüote ja vastsündinud hiirte (P0) ajukoore basaalse piirkonna uurimisele, kasutades klassikalist hematoksüliin-eosiin (HE) värvingut peaaegu histoloogilistel lõikudel. Analüüsi tulemusena leiti, et E14.5 kontroll-embrüotel moodustasid neuraalsed rakud ajukoore basaalsemas osas korrapärase ja ühtlase CP (Joonis 5A, mustad nooled). Seevastu, *NestinRic8<sup>-/-</sup>* embrüotel oli CP rakkude paigutumine märksa korrapäratum ning rakkude ühtlast joondumist ei täheldatud (Joonis 5B; mustad nooled).



**Joonis 5.** E14.5 embrüote otsaju histoloogiline analüüs. (A) Kontroll-embrüo (Ctrl) ja (B) *NestinRic8<sup>-/-</sup>* embrüo (Ric8CKO) frontaallõik otsaju piirkonnast. Mustad nooled tähistavad kortikaalplaadi (CP) piirkonda. Lühendid: CP, kortikaalplaat; L, vatsakese luumen; VZ, ventrikulaartsoon. Mõõtkava: 100 µm.

Hiire otsaju histogeneesi analüüs vastsündinud (P0) kontroll-hiirtel ning *NestinRic8<sup>-/-</sup>* hiirtel näitas silmapaistvat erinevust marginaaltsoonis (MZ). *NestinRic8<sup>-/-</sup>* embrüotel olid ülemiste kortikaalsete kihtide neuronid paigutunud ebatüüpiliselt MZ-i (Joonis 6B ja D) võrrelduna kontroll-embrüotega, kus neuraalsete rakkude invasioon MZ-i ei olnud märgatav ja ka ülemiste kortikaalsete kihtide paigutus oli korrektne (Joonis 6A ja C).



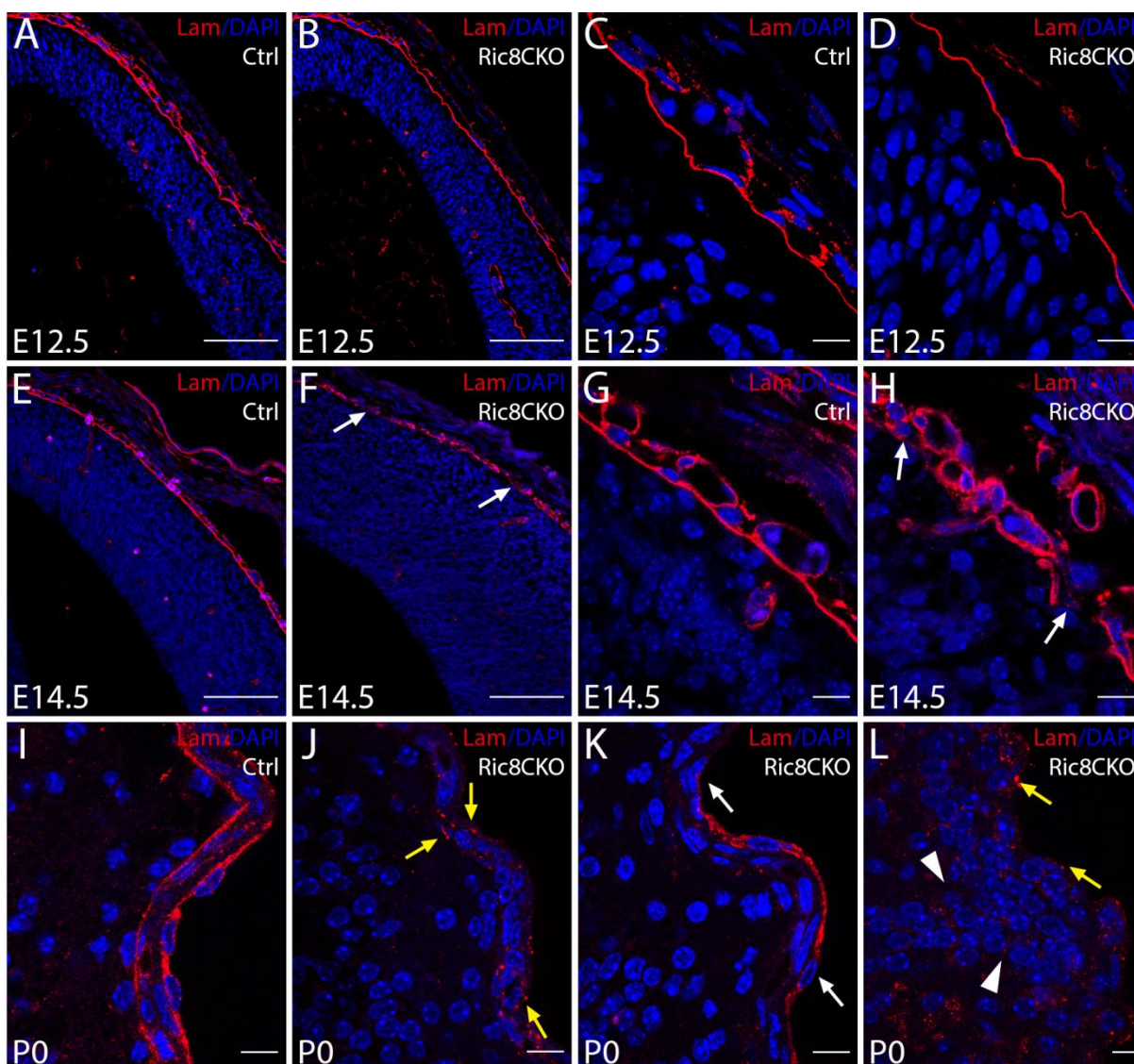
**Joonis 6. Vastsündinud (P0) hiirte histoloogiline analüüs.** (A) Kontroll-hiire (Ctrl) ja (B) *NestinRic8<sup>-/-</sup>* hiire (Ric8CKO) otsaju koronaallõigu hematoksüliin-eosiin (HE) värving. (C, D) Suurendatud väljalõiked vastavalt A ja B piltidelt. Mustad nooled tähistavad piirkondi, kus ülemiste kihtide neuronid on liikunud lainetena marginaaltsooni (MZ). Lühendid: MZ, marginaaltsoon. II-IV, V ja VI tähistavad erinevaid kortikaalseid kihte. Mõõtkava: 100 µm.

### 2.3.3. Basaalmembraani markeri Laminiin-1 lokalisatsiooni analüüs

Hiire otsaju histoloogiline analüüs näitas, et normaalne kortikogenees *NestinRic8<sup>-/-</sup>* loomadel on häiritud, mistõttu otsustati hinnata E12.5, E14.5 ning P0 vanustel *NestinRic8<sup>-/-</sup>* hiirtel BM-i terviklikkust otsaju piirkonnas, kasutades Laminiin-1 kui BM-i markerit (Ekblom jt., 2003; Hohenester ja Yurchenco, 2013). Immunofluorestsents analüüsi tulemusena peapiirkonnast tehtud lõikudel selgus, et embrüonaalses vanuses E12.5 kontroll-embrüotel (n=2) ning *NestinRic8<sup>-/-</sup>* embrüotel (n=2) erinevusi Laminiin-1 lokalisatsiooni osas ei esinenud. Mõlemal grupil oli Laminin-1 jaotunud ühtlaselt eeldatavasse BM-i piirkonda ja seega BM näis terviklik (Joonis 7A-D). Alates vanusest E14.5 hakkasid *NestinRic8<sup>-/-</sup>* embrüote (n=3) otsajus ilmneva märgatavad muutused Laminiin-1 lokalisatsiooni mustris. Võrreldes kontroll-embrüotega (n=3) (Joonis 7E ja G), kellel BM-i marker oli paigutatud korrektselt, oli *NestinRic8<sup>-/-</sup>* embrüotel märgata mitmetes piirkondades Laminiin-1 ekspressiooni puudumist või ebakorrektsset lokalisatsiooni, mis võib viidata BM-i katketele või defektidele (Joonis 7F ja H).

Järgnevalt teostati uuringud vastsündinud (P0) hiirte ajudega, kus BM-i defektid pehmekelme ja otsaju korteksi vahelises piirkonnas olid *NestinRic8<sup>-/-</sup>* loomadel veelgi ilmekamad. Kui kontroll-hiirtel (n=3) oli Laminiin-1 detekteeritav ühtlase intaktse struktuurina pehmekelme all (Joonis 7I), siis *NestinRic8<sup>-/-</sup>* loomadel (n=3) olid märgatavad erineva raskusastmega BM-i defektid. Kõige enam esines olukordi, kus *NestinRIC8<sup>-/-</sup>* loomadel Laminin-1 lokalisatsiooni muster joonistus üksikute fragmentidena (Joonis 7J). Samas täheldati kohati ka mõnevõrra tervemat ehk väiksemate katketega BM-i (Joonis 7K). Oluline tähelepanek oli see, et Laminiin-1 ei olnud detekteeritav või oli väga vähesel määral ekspresseeritud piirkondades,

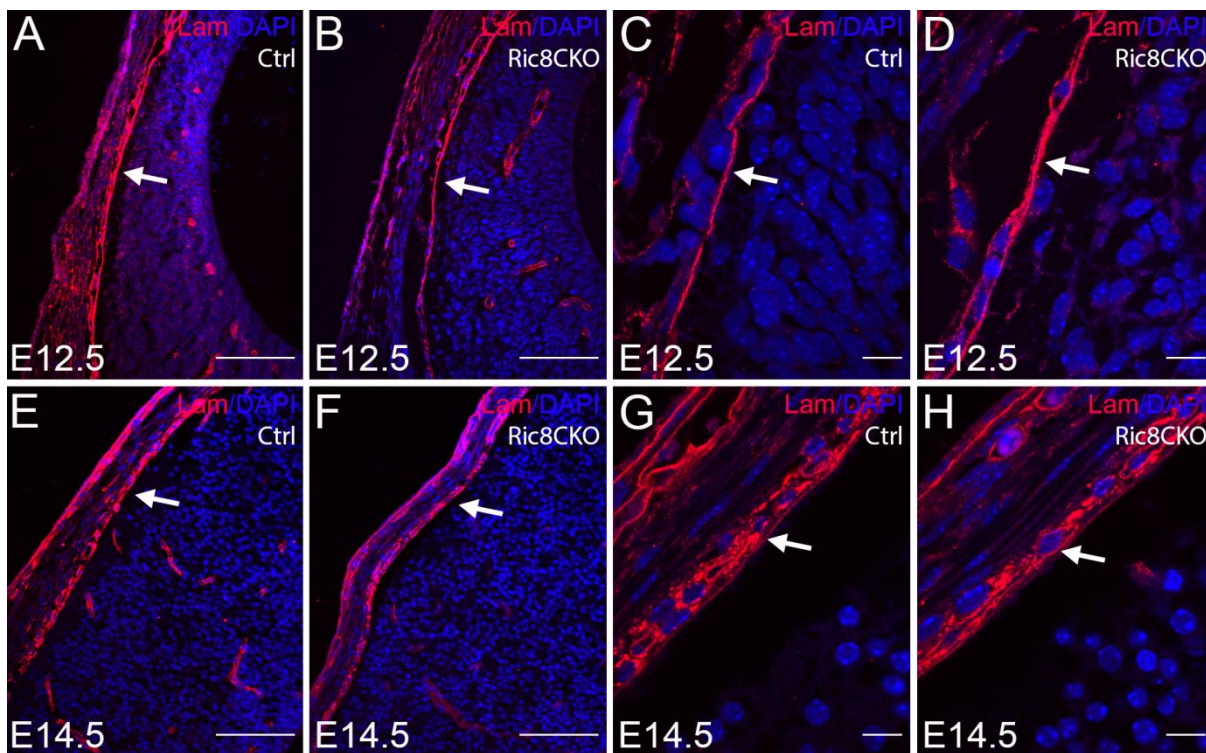
kus ajukoore basaalsemate kihtide neuronid olid liikunud ebakorrektselt MZ-i ehk moodustasid ektoopiaid MZ-s (Joonis 7L).



**Joonis 7. Laminiin-1 immunofluorestsentsanalüüs hiire anteriorse peapiirkonna frontaallõikudel.** Basaalmembraani (BM) marker Laminiin-1 (punane) otsajukoore ja pehmekelme vahelises piirkonnas ning teistes BM-i piirkondades. DNA on märgistatud DAPI-ga (sinine). Kontroll-embrüod on märgistatud (Ctrl) ja *NestinRIC8<sup>-/-</sup>* hiired (Ric8CKO). Arengupäevad on toodud all vasakul vastavalt E12.5, E14.5 ja P0. (C, D) Suurendatud väljalõiked vastavalt piltidelt A ja B. (G, H) Suurendatud väljalõiked vastavalt piltidelt E ja F. Valged nooled viitavad fragmenteerunud ja katkendlikule Laminin-1 ekspressioonile BM-is. Kollased nooled näitavad fragmenteerunud Laminin-1 lokalisatsiooni ja valged nooleotsad viitavad marginaaltsooni migreerunud neuroneid. Mõõtkava: (A, B, E, F, I, J) 100 µm, (L) 60 µm, (C, D, G, H, K) 10 µm.

Kuna ajukelme päritolu on pea eesmisel ja keskmisel osal erinev, siis hinnati Laminiin-1 ekspressiooni vanuses E12.5 ja E14.5 lisaks anteriorsele peapiirkonna osale (otsaju piirkond) ka mediaalsemas piirkonnas (keskaju piirkond). Katsete tulemusena selgus, et vanuses E12.5 oli nii kontroll-embrüotel (n=2) (Joonis 8A ja C) kui ka *NestinRic8<sup>-/-</sup>* embrüotel (n=2) (Joonis

8B ja D) Laminiin-1 lokalisatsiooni muster muutusteta, seega BM oli ilmselt terviklik ja tulemused sarnanesid pea eesmise piirkonnaga (Joonis 7A-D). BM-i defekte keskaju piirkonnast tehtud lõikudel ei olnud märgata *NestinRic8<sup>-/-</sup>* embrüotel ka hilisemas embrüonaalses staadiumis (E14.5), mis erineb suuresti otsaju piirkonnast tehtud pea frontaallõikude analüüsist, kus BM-i defektid olid ilmsed (Joonis 8F ja H).



**Joonis 8. Laminiin-1 immunofluorestsentsanalüüs hiire keskaju peapiirkonna frontaallõikudel.**

Basaalmembraani (BM) marker Laminiin-1 (punane) keskajukoore ja pehmekelme vahelises piirkonnas ning teistes BM-i piirkondades. DNA on märgistatud DAPI-ga (sinine). Kontroll-embrüod on märgistatud (Ctrl) ja *NestinRIC8<sup>-/-</sup>* loomad (Ric8CKO). Arengupäevad on toodud all vasakul vastavalt E12.5 ja E14.5. (C, D) Suurendatud väljalõiked vastavalt piltidelt A ja B. (G, H) Suurendatud väljalõiked vastavalt piltidelt E ja F. Valged nooled viitavad muutumatule Laminin-1 ekspressioonile intaktsetes BM-s. Mõõtkava: (A, B, E, F) 100 µm, (C, D, G, H) 10 µm.

## 2.4. Arutelu

Varasemates uurimustöodes on *NestinCre;RIC8<sup>lacZ/lox</sup>* hiirtel vanuses E10.5-E12.5 täheldatud mitmeid embrüonaalseid neurospetsiifilisi väärearenguid (Keiu Kase magistritöö, 2010; Epp Kaleviste bakalaureusetöö, 2012). Käesoleva töö põhieesmärgiks oli uurida *NestinCre;RIC8<sup>lacZ/lox</sup>* hiiri, kel on neuraalsetest eellasrakkudest *Cre/Lox* meetoodika abil *Ric8* välja lülitatud. Embrüotel vanustes E12.5 (neurogeneesi algfaas) ja E14.5 (neurogeneesi tippfaas) ning vastsündinud *NestinCre;RIC8<sup>lacZ/lox</sup>* hiirtel uuriti otsaju arengu kujunemist, võimalikke defekte kortikogeneesis ja neuraalsete rakkude migratsiooni.

Käesolevas töös leiti, et vanuses E14.5 oli *NestinRic8<sup>-/-</sup>* hiirtel kortikaalplaadi (CP) rakkude paigutumine korrapäratu. Varasemalt on teada, et CP kujuneb välja hiire embrüonaalses vanuses E12-E18, kui rakud liiguvad VZ-st pehmekelme poole (Halfter jt., 2002). Samuti on väidetud, et nii Cajal-Retzius' e rakud kui ka ajukelmed eritavad signaalfaktoreid, mis aitavad neuronitel migreeruda õigesse suunda (Hartmann jt., 1999). Cajal-Retzius' e rakkude poolt sekreteeritav glükoproteiin Reelin võib samuti mõjutada CP neuronite korrapärast positsioneerumist (Halfter jt., 2002). Cajal-Retzius' e rakkude puudumise või valesti migreerumise korral ei saa CP neuronid enam stopp-signaale, mistõttu moodustavad rakud ajukoore pinnal ektoopiaid (Halfter jt., 2002). Kuna RIC8 on *NestinRic8<sup>-/-</sup>* hiirtel välja lülitatud spetsiifiliselt neuraalsetest eellasrakkudest, siis võib eeldada, RIC8 võib olla välja lülitatud ka Cajal-Retzius' e rakkudest, mis migreeruvad tangentsiaalselt ganglioni kõrgendikult vanuses E10.5 (Hevner jt., 2003). Tuginedes kirjanduses avaldatud andmetele on põhjust oletada, et *NestinRIC8<sup>-/-</sup>* hiirtel on CP rakud ebaühtlaselt asetunud Cajal-Retzius' est tulenevate signaalihäirete tõttu. Antud töös Cajal-Retzius' e rakke detailselt ei uuritud, aga põhjusel, et need rakud on äärmiselt olulised ajukoore arenguks, tuleks edasistes uuringutes *NestinCre;RIC8<sup>lacZ/lox</sup>* hiireliiniga seda kindlasti teha.

Antud töös selgus, et vastsündinud (P0) *NestinRIC8<sup>-/-</sup>* hiirtel on osad välimiste kortikaalsete kihtide neuronid migreerunud ebatüüpiliselt marginaalsoonini (MZ), samuti täheldati ajukoore kihtidel ebaloomulikku lainelisust ning kihtide organiseerituse häireid. Sarnaseid MZ-i ektoopiaid on täheldatud ka hiirtel, kes kannavad mutatsiooni  $G\alpha_{12}$  ja  $G\alpha_{13}$  kodeerivates geenides (Moers jt., 2008). On teada, et RIC8 toimib GEF-ina  $G\alpha_q$ ,  $G\alpha_i$ ,  $G\alpha_o$ ,  $G\alpha_{12}$  ja  $G\alpha_{13}$  valkudele (Tall jt., 2003) ja pikendab ning võimendab neilt G-valkudel tulenevat signaali (Tall jt., 2003). Kirjanduses on näidatud, et  $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$  puudumine neuronitest põhjustab postmitootiliste rakkude migreerumist valedesse asukohtadesse.  $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ -ga seostuvad retseptorid vahendavad stopp-signaale, mis on vajalikud korrapäraseks neuronite migreerumiseks (Moers jt., 2008). Antud uurimuses oli *NestinRIC8<sup>-/-</sup>* hiirtel RIC8

mahasurutud, mistõttu võis  $G\alpha$  signaal olla võimendamata ning rakud valesi paigutatud. Sellest tulenevalt võib oletada, et RIC8 väljalülitamine põhjustab defekte normaalses kortikogeneesis. Edaspidi oleks kindlasti vajalik uurida immunohistokeemilise analüüsi põhjal *NestinCre;RIC8<sup>lacZ/lox</sup>* hiireliinis  $G\alpha_{13}$  ekspressiooni taseme võimalikke muutusi neuronites.

Mitmed uurimustööd on täheldanud, et häired rakkude migreerumises viitavad defektidele basaalmembraanis (BM) (Li jt., 2008; Zarbališ jt., 2007, Hecht jt., 2010). Käesoleva töö histoloogiline analüüs näitas, et normaalne kortikogenees *NestinRic8<sup>-/-</sup>* loomadel oli häiritud. Seetõttu hinnati hiirte BM-i terviklikkust pea otsaju piirkonnas. BM mängib olulist rolli mitmetes bioloogilistes protsessides, nagu rakkude kasv, diferentseerumine ja migratsioon (Erickson ja Couchmann, 2000). Kirjanduses on BM-i defekte kõige enam seostatud ajukelmetega (Zarbališ jt., 2007; Hecht jt., 2010; Siegenthaler jt., 2009). Ajukelme fibroblastid sekreteerivad BM-i põhilisi komponente: laminiini, kollageen IV ja nidogeeni (Li jt., 2008). Nende komponentide või rakk-ECM kontakti vahendavate valkude eemaldamine võib viia tõsiste aju arengu häireteni (Siegenthaler ja Pleasure, 2011; Beggs jt., 2003; Halfter jt., 2002). Bakalaureusetöös hinnati BM-i terviklikkust Laminiin-1 lokalisatsiooni põhjal. Vanuses E12.5 kontroll-embrüotel ning *NestinRic8<sup>-/-</sup>* embrüotel Laminiin-1 lokalisatsioon oli ühtlane, BM näis terviklik. Sarnaselt käesoleva uurimuse tulemustega, on katsed hiirtega, kellel esinevad hüpomorfsed mutatsioonid *Foxc1* geenis (*Foxc1<sup>hith/hith</sup>*) näidanud, et vanuses E12.5 BM-is katkeid ei esine (Hecht jt., 2010). Saadud tulemust võib põhjendada ajukelme väljakujunemise perioodidega. Nimelt tekivad pehme kelme ja ämblikvõrkkelme vanuses E13 ning kõvakelme E14, seega vanuseks E12.5 pole veel ajukelmed korralikult välja kujunenud (Siegenthaler ja Pleasure, 2011). Sellest tulenevalt võib oletada, et BM on *NestinRIC8<sup>-/-</sup>* hiirtel vanuses E12.5 terve, sest ajukelmed pole veel defektsed ja nendelt ei tule signaale, mis seda lõhuks.

Esimesed muutused *NestinRic8<sup>-/-</sup>* embrüotel Laminiin-1 lokalisatsioonis ilmsid hiire neurogeneesi tippfaasis, vanuses E14.5. Laminiin-1 ekspressioon oli kohati puudulik, mis võis viidata katketele BM-is. Töögrupi uuringud *Foxc1<sup>hith/hith</sup>* hiirtega vanuses E14.5 sarnaseid tulemusi ei andnud. *Foxc1<sup>hith/hith</sup>* embrüotel ilmsid katked BM-is alates embrüonaalsest vanusest E18.5 (Zarbališ jt., 2007). RIC8 väljalülitamisel tekkinud häired olid ulatuslikumad kui *Foxc1* mahasurumisel, mille põhjusteks võivad olla erinevalt toimivad signaalirajad.

Vastsündinud *NestinRic8<sup>-/-</sup>* hiirtel (P0) olid defektid BM-is veelgi silmapaistvamad. Kõige enam täheldati Laminiin-1 lokalisatsiooni üksikute fragmentidena. Samas esines olukordi, kus BM oli mõnevõrra tervem. Laminiin-1 ekspressioon puudus või oli vähesel määral tuvastatav

piirkondades, kus neuronid olid liikunud MZ-i ja moodustasid seal ektoopiaid. Antud uurimusega sarnaseid tulemusi on saadud töögrupi poolt, mis on uurinud adhesiooniga seotud GPCR perekonda kuuluva retseptori GPR56 *knock-out* hiiri. GPR56 esineb sarnaselt RIC8-ga neuraalsetes eellasrakkudes ja GPR56 väljalülitamine annab käesoleva tööga analoogseid tulemusi nii BM-i struktuuris kui ka rakkude paiknemises. Vanuses P0.5, P14 ja P16 olid GPR56 mutantidel MZ-i ektoopiaid tuvastatavad ajukoore anterioorses osas, posterioorses osas rakkude kogumikke ei ilmnunud (Li jt., 2008). Ka antud töös täheldati *NestinRIC8<sup>-/-</sup>* vastündinud hiirte ajalõikudel MZ-i ektoopiaid otsaju anterioorses osas silmapaistvalt rohkem kui mediaalses piirkonnas. Sellest tulenevalt analüüsiti käesolevas uurimuses põhjalikumalt ka pea keskaju piirkonda. Kraniaalsed neuraalharja rakud migreeruvad otsajju ning diferentseeruvad kolju otsmikuluuks, näoluudeks ja ajukelmeteks (Zarbalis jt., 2007). Varasemalt on näidatud, et otsaju katvad kelmed pärinevad kraniaalsest neuraalharjast, kesk-, taga- ja seljaaju kelmed aga somaatilise mesodermist (Etchevers jt., 1999; Jiang jt., 2002; Couly jt., 1992). *NestinCre* hakkab ekspresseeruma närvisüsteemis embrüonaalses vanuses E9.5-E10.5 (Keiu Kase magistritöö, 2010; Graus-Porta jt., 2001). Samuti on leitud, et *NestinCre* veresoontes ega ka ajukelmetes ei ekspresseeru (Graus-Porta jt., 2001). Samas RIC8 ekspressiooni arenevas närvisüsteemis on kõige varasemalt kirjeldatud vanuses E9.5 kraniaalganglionites (Tõnissoo jt., 2003). Seega võib oletada, et otsajju migreeruvad kraniaalsed neuraalharja rakud võivad olla RIC8 puudulikud ja osaleda seeläbi kelmete arengudefektide tekkes. Kuna keskaju katvad kelmed on mesodermaalset päritolu, ei tohiks nende areng olla häiritud ning BM peaks olema terve. Seda kinnitasid ka immunohistokeemilise analüüsi katsed, kus tulemusena selgus, et vanuses E12.5 ja E14.5 oli nii kontroll-embrüotel kui ka *NestinRIC8<sup>-/-</sup>* embrüotel BM keskajus terviklik.

Kirjandusele põhinedes ja antud töö tulemusi analüüsides võib kokkuvõtvalt öelda, et RIC8 mängib äärmiselt olulist rolli hiire kortikogeneesis. RIC8 väljalülitamine neuraalsetest eellasrakkudest põhjustab defekte BM-i terviklikkuses, mistõttu rakkude migreerumine oma lõplikesse positsioonidesse ei ole korrektne ning ajukoore ajalis-ruumiline moodustumine on häiritud.

## KOKKUVÕTE

Täiskasvanud imetaja ajukoor on jaotunud erinevateks rakukihtideks. Selline kihistumine kujuneb välja, kui rakud migreeruvad korrapäraselt oma algsest paiknemiskohast lõplikule positsioonile. Antud bakalaureusetöö eesmärgiks oli uurida ja kirjeldada neuraalsete eellasrakkude konditsionaalsete *NestinCre;RIC8<sup>lacZ/lox</sup>* hiirte ots- ja keskaju arengut, võimalikke defekte kortikogeneesis ja neuraalsete rakkude migratsioonis. Vanuses E14.5 ja P0 teostati *NestinCre;RIC8<sup>lacZ/lox</sup>* hiirte parafiinlõikudele hematoksüliin-eosiin (HE) värving ja võrreldi ajukoore histogeneesi. Immunohistokeemilise analüüsi põhjal hinnati vanuses E12.5, E14.5 ja P0 *NestinCre;RIC8<sup>lacZ/lox</sup>* embrüote ots- ja keskaju BM-i intaksust Laminiin-1 lokalisatsiooni põhjal.

Bakalaureusetöö kokkuvõtteks tehti järgmised järeldused:

- Vanuses E14.5 on CP rakud *NestinRIC8<sup>-/-</sup>* embrüotel korrapäratult asetunud.
- Vastsündinud *NestinRIC8<sup>-/-</sup>* hiirte (P0) osad ülemiste kortikaalsete kihtide neuronid migreeruvad ebatüüpiliselt MZ-i ehk moodustavad ektoopiaid.
- Vanuses E12.5 on *NestinRIC8<sup>-/-</sup>* embrüotel BM terviklik.
- Esimesed katked BM-is ilmnevad *NestinRIC8<sup>-/-</sup>* embrüotel vanuses E14.5.
- Vastsündinud *NestinRIC8<sup>-/-</sup>* hiirtel (P0) on BM fragmenteerunud, mis on eriti ilmekas piirkonnas, kus neuronid migreeruvad MZ-i ehk moodustavad ektoopiaid.
- *NestinRIC8<sup>-/-</sup>* embrüotel vanuses E12.5 ja E14.5 on keskaju piirkonnas BM terviklik.

## The role of guanine nucleotide exchange factor RIC8 in mouse corticogenesis

Kirstin Karis

### SUMMARY

Normal development of the nervous system requires a series of complex and interrelated processes. Accurate patterns of cell division and migration play a crucial role in forming an adult six-layered neocortex. Defects in cell migration can lead to severe brain malformations like microcephaly, hydrocephaly and cobblestone lissencephaly, where cortical neurons move through breaches in the pial basement membrane and form neuronal ectopias on the surface of the brain.

All of the migration processes are coordinated by different signaling networks. G proteins are involved in signal transmitting pathways. G-proteins transmit signals from the cell surface receptors to the effector proteins. One of the main regulators in G protein signaling pathway is considered to be guanine nucleotide exchange factor RIC8. Previous studies have shown that deletion of *Ric8* from neural precursor cells causes various developmental abnormalities.

The main aim of this work was to characterize and analyze the development of the forebrain and midbrain, potential defects in corticogenesis and cell migration of neural precursor specific *NestinCre;RIC8<sup>lacZ/lox</sup>* (*NestinRIC8<sup>-/-</sup>*) conditional knockout mice at different developmental stages. *NestinRIC8<sup>-/-</sup>* mice were compared with littermates. At the age E14.5 and P0 serial sections of the brain were stained with hematoxylin-eosin. Immunohistochemical analyses were performed to evaluate the basement membrane integrity by Laminin-1 localization at the age E12.5, E14.5 and P0.

Present study showed that at the age E14.5 *NestinRIC8<sup>-/-</sup>* embryos had disorganized cortical plate cells. The cortical cells of the *NestinRIC8<sup>-/-</sup>* newborn mice invaded into the marginal zone and formed cortical ectopias. Further analyses gave diverse results in the basement membrane integrity. At the age E12.5 the basement membrane was intact. Defects in basement membrane integrity started to appear at E14.5 as some fragmentation in Laminin-1 expression could be observed. In *NestinRIC8<sup>-/-</sup>* newborn mice the basement membrane degenerated leaving only single fragments behind. Furthermore, in newborn mutants the most drastic disruptions in Laminin-1 localization appeared in the areas where neurons migrated into marginal zone and formed ectopias.

These results indicate that RIC8 is essential for proper corticogenesis and loss of RIC8 function from neural precursor cells influence the integrity of basement membrane, which leads to defects in cell positioning and cortical lamination.

## TÄNUSÕNAD

Sooviksin tänada oma juhendajaid Keiu Kaske ja Tambet Tõnissood põneva lõputöö teema, igakülgse toetuse, abivalmiduse ning asjakohaste nõuannete eest.

Eksperimentaalse osa läbiviimisel olid suureks abiks Laura Tikker, Katrin Ruisu ja Toomas Jagomäe. Suured tänud ka kogu ülejäänud laborikollektiivile.

## KIRJANDUSE LOETELU

### Artiklid

Amoureux, M. C, Nicolas, S., Rougon, G. (2012). NCAM180 regulates Ric8A membrane localization and potentiates  $\beta$ -adrenergic response. *PLoS One*. 7(2): e32216.

Bastiani, C., Mendel, J. (2006). Heterotrimeric G proteins in *C. Elegans*. *WormBook*. 13: 1-25.

Beggs, H. E., Schahin-Reed, D., Zang, K., Goebbels, S., Nave, K. A., Gorski, J., Jones, K. R., Sretavan, D., Reichardt, L. F. (2003). FAK deficiency in cells contributing to the basal lamina results in cortical abnormalities resembling congenital muscular dystrophies. *Neuron*. 40(3): 501-14.

Belmadani, A., Tran, P. B., Ren, D., Assimacopoulos, S., Grove, E. A., Miller, R. J. (2005). The chemokine stromal cell-derived factor-1 regulates the migration of sensory neuron progenitors. *J. Neurosci*. 25(16): 3995-4003.

Borrell, V., Marín, O. (2006). Meninges control tangential migration of hem-derived Cajal-Retzius cells via CXCL12/CXCR4 signaling. *Nat. Neurosci*. 9(10): 1284-93.

Chan, P., Thomas, C. J., Sprang, S. R., Tall, G. G. (2013). Molecular chaperoning function of Ric-8 is to fold nascent heterotrimeric G protein  $\alpha$  subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 110(10): 3794-9.

Chenn, A., McConnell, S. K. (1995). Cleavage orientation and the asymmetric inheritance of Notch1 immunoreactivity in mammalian neurogenesis. *Cell*. 82(4): 631-41.

Couly, G. F., Coltey, P. M., Le Douarin, N. M. (1992). The developmental fate of the cephalic mesoderm in quail-chick chimeras. *Development*. 114(1): 1-15.

Crossin, K. L., Krushel, L. A. (2000). Cellular signaling by neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Dev. Dyn*. 218(2): 260-79.

David, N. B., Martin, C. A., Segalen, M., Rosenfeld, F., Schweisguth, F., Bellaiche, Y. (2005). *Drosophila* Ric-8 regulates Gai cortical localization to promote Gai-dependent planar orientation of the mitotic spindle during asymmetric cell division. *Nature Cell Biol*. 7(11): 1083-1090.

Eklblom, P., Lonai, P., Talts, J. F. (2003). Expression and biological role of laminin-1. *Matrix. Biol*. 22(1): 35-47.

- Erickson, A. C., Couchman, J. R. (2000). Still more complexity in mammalian basement membranes. *J. Histochem. Cytochem.* 48(10): 1291-306.
- Etchevers, H. C., Couly, G., Vincent, C., Le Douarin, N. M. (1999). Anterior cephalic neural crest is required for forebrain viability. *Development.* 126(16): 3533-43.
- Fenech, C., Patrikainen, L., Kerr, D. S., Grall, S., Liu, Z., Laugerette, F., Malnic B., Montmayeur, J. P. (2009). Ric-8A, a G $\alpha$  Protein Guanine Nucleotide Exchange Factor Potentiates Taste Receptor Signaling. *Front. Cell. Neurosci.* 3: 11.
- Fietz, S. A., Kelava, I., Vogt, J., Wilsch-Bräuninger, M., Stenzel, D., Fish, J. L., Corbeil, D., Riehn, A., Distler, W., Nitsch, R., Huttner, W. B. (2010). OSVZ progenitors of human and ferret neocortex are epithelial-like and expand by integrin signaling. *Nat. Neurosci.* 13(6): 690-9.
- Figuroa, M., Hinrichs, M.V., Bunster. M., Babbitt, P., Martinez-Oyanedel. J., Olate, J. (2009). Biophysical studies support a predicted superhelical structure with armadillo repeats for Ric8. *Protein. Sci.* 18: 1139-45.
- Franco, S. J., Müller, U. (2013). Shaping our minds: stem and progenitor cell diversity in the mammalian neocortex. *Neuron.* 77(1): 19-34.
- Fuentealba, J., Toro-Tapia, G., Arriagada, C., Riquelme, L., Beyer, A., Henriquez, J. P., Caprile, T., Mayor, R., Marcellini, S., Hinrichs, M. V., Olate, J. and Torrejón, M. (2013). Ric-8A, a guanine nucleotide exchange factor for heterotrimeric G proteins, is critical for cranial neural crest cell migration. *Dev. Biol.* 378(2): 74-82.
- Gabay, M., Pinter, M. E., Wright, F. A., Chan, P., Murphy, A. J., Velenzuela, D. M., Yancopoulos, M., Tall, G. G. (2011). Ric-8 proteins are molecular chaperones that direct nascent G protein  $\alpha$  subunit membrane association. *Sci. Signal.* 4(200): 79.
- Gal, J. S., Morozov, Y. M., Ayoub, A. E., Chatterjee, M., Rakic, P., Haydar, T. F. (2006). Molecular and morphological heterogeneity of neural precursors in the mouse neocortical proliferative zones. *J. Neurosci.* 26(3): 1045-56.
- Graus-Porta, D., Blaess, S., Senften, M., Littlewood-Evans, A., Damsky, C., Huang, Z., Orban, P., Klein, R., Schittny, J. C., Müller, U. (2001). Beta1-class integrins regulate the development of laminae and folia in the cerebral and cerebellar cortex. *Neuron.* 31(3):367-79.
- Gupta, A., Tsai, L. H., Wynshaw-Boris, A. (2002). Life is a journey: A genetic look at neocortical development. *Nature. Rev. Genet.* 3: 342-355.

- Götz, M., Huttner, W. B. (2005). The cell biology of neurogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 6(10): 777-88.
- Halfter, W., Dong, S., Yip, Y. P., Willem, M., Mayer, U. (2002). A critical function of the pial basement membrane in cortical histogenesis. *J. Neurosci.* 22(14): 6029-40.
- Hartfuss, E., Galli, R., Heins, N., Götz, M. (2001). Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia. *Dev. Biol.* 229(1): 15-30.
- Hartfuss, E., Förster, E., Bock, H. H., Hack, M. A., LePrince, P., Luque, J. M., Herz, J., Frotscher, M. and Götz, M. (2003). Reelin signaling directly affects radial glia morphology and biochemical maturation. *Development.* 130: 4597-4609.
- Hartmann, D., De Strooper, B., Saftig, P. (1999). Presenilin-1 deficiency leads to loss of Cajal-Retzius neurons and cortical dysplasia similar to human type 2 lissencephaly. *J. Neurosci.* 19(14): 719-27.
- Hecht, J. H., Siegenthaler, J. A., Patterson, K. P., Pleasure, S. J. (2010). Primary cellular meningeal defects cause neocortical dysplasia and dyslamination. *Ann. Neurol.* 68(4): 454-64.
- Hevner, R. F., Neogi, T., Englund, C., Daza, R. A., Fink, A. (2003). Cajal-Retzius cells in the mouse: transcription factors, neurotransmitters, and birthdays suggest a pallial origin. *Dev. Brain. Res.* 141(1-2):39-53.
- Hohenester, E., Yurchenco, P. D. (2013). Laminins in basement membrane assembly. *Cell. Adh. Migr.* 7(1): 56-63.
- Huttner, W. B., Kosodo, Y. (2005). Symmetric versus asymmetric cell division during neurogenesis in the developing vertebrate central nervous system. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 17(6): 648-57.
- Ito, Y., Yeo, J. Y., Chytil, A., Han, J., Bringas, P. Jr., Nakajima, A., Shuler, C. F., Moses, H. L., Chai, Y. (2003). Conditional inactivation of *Tgfb $\beta$ 2* in cranial neural crest causes cleft palate and calvaria defects. *Development.* 130(21): 5269-80.
- Jiang, X., Iseki, S., Maxson, R. E., Sucov, H. M., Morriss-Kay, G. M. (2002). Tissue origins and interactions in the mammalian skull vault. *Dev. Biol.* 241(1): 106-16.
- Kaleviste, E. (2012). Neuraalsete eellasrakkude jagunemise, tekke ning apoptoosi uurimine *NestinCre;Ric8lacZ/lox* hiireliinis vanuses E10.5 – E12.5. Bakalaureusetöö.
- Kask, K. (2010). Nukleotiidivahetusfaktor *Ric8* uurimine imetajate neurogeneesis ja *NestinCre;Ric8lacZ/lox* hiireliini iseloomustamine. Magistritöö.

- Kataria, R., Xu, X., Fusetti, F., Keizer-Gunnink, I., Jin, T., van Haastert, P. J., Kortholt, A. (2013). Dictyostelium Ric8 is a nonreceptor guanine exchange factor for heterotrimeric G proteins and is important for development and chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110(16): 6424-9.
- Kelava, I., Reillo, I., Murayama, A.Y., Kalinka, A.T., Stenzel, D., Tomancak, P., Matsuzaki, F., Lebrand, C., Sasaki, E., Schwamborn, J.C., Okano, H., Huttner, W.B., Borrell, V. (2012). Abundant occurrence of basal radial glia in the subventricular zone of embryonic neocortex of a lissencephalic primate, the common marmoset *Callithrix jacchus*. *Cereb.Cortex.* 22(2):469-81.
- Kowalczyk, T., Pontious, A., Englund, C., Daza, R. A., Bedogni, F., Hodge, R., Attardo, A., Bell, C., Huttner, W. B., Hevner, R. F. (2009). Intermediate neuronal progenitors (basal progenitors) produce pyramidal-projection neurons for all layers of cerebral cortex. *Cereb. Cortex.* 19(10): 2439-50.
- Kriegstein, A. R., Götz, M. Radial glia diversity: a matter of cell fate. (2003). *Glia.* 43(1): 37-43.
- Li, S., Jin, Z., Koirala, S., Bu, L., Xu, L., Hynes, R. O., Walsh, C. A., Corfas, G., Piao, X. (2008). GPR56 regulates pial basement membrane integrity and cortical lamination. *J.Neurosci.* 28(22):5817-26.
- Ma, S., Kwon, H. J., Huang, Z. J. (2012). Ric-8a, a guanine nucleotide exchange factor for heterotrimeric G proteins, regulates bergmann glia-basement membrane adhesion during cerebellar foliation. *Neurosci.* 32(43): 14979-93.
- Marín, O., Rubenstein, J. L. R. (2003). Cell migration in the forebrain. *Annu. Rev. Neurosci.* 26: 441–83.
- Miller, K. G., Alfonso, A., Nguyen, M., Crowell, J. A., Johnson, C. D., Rand, J. B. (1996). A genetic selection for *Caenorhabditis elegans* synaptic transmission mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 12593-12598.
- Miller, K. G., Emerson, M. D., McManus, J. R., Rand, J. B. (2000). RIC-8 (Synembryn): a novel conserved protein that is required for Gq $\alpha$  signaling in the *C. elegans* nervous system. *Neuron.* 27(2): 289-99.
- Miller, K. G., Rand, J. B. (2000). A role for RIC-8 (Synembryn) and GOA-1 (G $\alpha$ ) in regulating a subset of centrosome movements during early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics.* 156(4): 1649-60.

- Miyata, T., Kawaguchi, A., Okano, H., Ogawa, M. Asymmetric inheritance of radial glial fibers by cortical neurons. (2001). *Neuron*. 31(5): 727-41.
- Moers, A., Nürnberg, A., Goebbels, S., Wettschureck, N., Offermanns, S. (2008). *Galpha12/Galpha13* deficiency causes localized overmigration of neurons in the developing cerebral and cerebellar cortices. *Mol. Cell. Biol.* 28(5): 1480-8.
- Nadarajah, B., Brunstrom, J. E., Grutzendler, J., Wong, R. O. L., Pearlman, A. L. (2001). Two modes of radial migration in early development of the cerebral cortex. *Nat. Neurosci.* 4: 143-150.
- Nagayoshi, S., Hayashi E., Abe, G., Osato, N., Asakawa, K., Urasaki, A., Horikawa, K., Ikeo, K., Takeda, H., Kawakami, K. (2008). Insertional mutagenesis by the *Tol2* transposon-mediated enhancer trap approach generated mutations in two developmental genes: *tcf7* and *synembryn-like*. *Development*. 135: 159-169.
- Niederreither, K., Subbarayan, V., Dollé, P., Chambon, P. (1999). Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development. *Nat. Genet.* 21(4): 444-8.
- Noctor, S.C., Flint, A.C., Weissman, T.A., Dammerman, R.S., Kriegstein, A.R. (2001). Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature*. 409(6821):714-20.
- Noctor, S.C., Flint, A.C., Weissman, T.A., Wong, W.S., Clinton, B.K., Kriegstein, A.R. (2002). Dividing precursor cells of the embryonic cortical ventricular zone have morphological and molecular characteristics of radial glia. *J.Neurosci.* 22(8):3161-73.
- Noctor, S. C., Martínez-Cerdeño, V., Ivic, L., Kriegstein, A. R. (2004). Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat. Neurosci.* 7(2): 136-44.
- Ogawa, M., Miyata, T., Nakajima, K., Yagyu, K., Seike, M., Ikenaka, K., Yamamoto, H., Mikoshiba, K. (1995). The reeler gene-associated antigen on cajal-retzius neurons is a crucial molecule for laminar organization of cortical neurons. *Neuron*. 14: 899-912.
- Radakovits, R., Barros, C. S., Belvindrah, R., Patton, B., Müller, U. (2009). Regulation of radial glial survival by signals from the meninges. *J. Neurosci.* 29(24): 7694-705.
- Romo, X., Pasten, P., Martinez, S., Soto, P. L., Ramirez de arellano, A., Torrejon, M., Montecino, M. V. H., Olate, J. (2007). Ric-8 is a GEF for Gsa and participates in maintaining meiotic arrest in *xenopus laevis* oocytes. *J. Cell. Physiol.* 214(3):673-80.

- Rougon, G., Hobert, O. (2003). New insights into the diversity and function of neuronal immunoglobulin superfamily molecules. *Annu. Rev. Neurosci.* 26: 207-38.
- Ruisu, K., Kask, K., Meier, R., Saare, M., Raid, R., Veraksitš, A., Karis, A., Tõnissoo, T., Pooga, M. (2013). Ablation of RIC8A function in mouse neurons leads to a severe neuromuscular phenotype and postnatal death. (2013). *PLoS One.* 8(8): e74031.
- Shitamukai, A., Matsuzaki, F. (2012). Control of asymmetric cell division of mammalian neural progenitors. *Dev. Growth. Differ.* 54(3): 277-86.
- Siegenthaler, J. A., Ashique, A. M., Zarbalis, K., Patterson, K. P., Hecht, J. H., Kane, M. A., Folias, A. E., Choe, Y., May, S. R., Kume, T., Napoli, J. L., Peterson, A. S., Pleasure, S. J. (2009). Retinoic acid from the meninges regulates cortical neuron generation. *Cell.* 139(3): 597-609.
- Siegenthaler, J. A., Pleasure, S. J. We have got you 'covered': how the meninges control brain development. (2011). *Curr. Opin. Genet. Dev.* 21(3): 249-55.
- Sillitoe, R. V. and Joyner, A. L. (2007). Morphology, molecular codes, and circuitry produce the three-dimensional complexity of the cerebellum. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 23: 549-577.
- Tall, G. G., Krumins, A. M., Gilman, A. G. (2003). Mammalian Ric-8A (Synembryn) is a heterotrimeric G $\alpha$  protein guanine nucleotide exchange factor. *J. Biol. Chem.* 278: 8356–8362.
- Thomas, C. J., Tall, G. G., Adhikari, A., Sprang, S. R. (2008). Ric-8A Catalyzes Guanine Nucleotide Exchange on G $\alpha_{i1}$  Bound to the GPR/GoLoco Exchange Inhibitor AGS3. *J. Biol. Chem.* 283: 23150-23160.
- Tõnissoo, T., Meier, R., Talts, K., Plaas, M., Karis, A. Expression of ric-8 (synembryn) gene in the nervous system of developing and adult mouse. (2003). *Gene. Expr. Patterns.* 3(5): 591-594.
- Tõnissoo, T., Kõks, S., Meier, R., Raud, S., Plaas, M., Vasar, E., Karis, A. (2006). Heterozygous mice with Ric-8 mutation exhibit impaired spatial memory and decreased anxiety. *Behav. Brain. Res.* 167(1): 42-8.
- Tõnissoo, T., Lulla, S., Meier, R., Saare, M., Ruisu, K., Pooga, M., Karis, A. (2010). Nucleotide exchange factor RIC-8 is indispensable in mammalian early development. *Dev. Dyn.* 239(12): 3404-15.
- Vellano, C. P., Shu, F. J., Ramineni, S., Yates, C. K., Tall, G. G., Hepler, J. R. (2011). Activation of the regulator of G protein signaling 14-Gai1 GDP signaling complex is

regulated regulated by resistance to inhibitors of cholinesterase-8A. *Biochemistry*. 50(5): 752-62.

Von Dannecker, L. E., Mercadante, A. F., Malnic, B. (2005). Ric-8B, an olfactory putative GTP exchange factor, amplifies signal transduction through the olfactory-specific G-protein  $G_{\alpha olf}$ . *J. Neurosci*. 25: 3793-3800.

Wang, L., Guo, D., Xing, B., Zhang, J. J., Shu, H. B., Guo, L., Huang, X. Y. (2011). Resistance to inhibitors of cholinesterase-8A (Ric-8A) is critical for growth factor receptor-induced actin cytoskeletal reorganization. *J. Biol. Chem*. 286(35): 31055-61.

Wang, X., Tsai, J. W., LaMonica, B., Kriegstein, A. R. (2011). A new subtype of progenitor cell in the mouse embryonic neocortex. *Nat. Neurosci*. 14(5): 555-561.

Wright, S. J., Inchausti, R., Eaton, C. J., Krystofova, S., Borkovich, K. A. (2011). RIC8 is a guanine-nucleotide exchange factor for  $G_{\alpha}$  subunits that regulates growth and development in *Neurospora crassa*. *Genetics*. 189(1): 165-76.

Yamada, K., Watanabe, M. (2002). Cytodifferentiation of Bergmann glia and its relationship with Purkinje cells. *Anat. Sci. Int*. 77(2): 94-108.

Ybot-Gonzalez, P., Gaston-Massuet, C., Girdler, G., Klingensmith, J., Arkell, R., Greene, N. D., Copp, A. J. (2007). Neural plate morphogenesis during mouse neurulation is regulated by antagonism of Bmp signalling. *Development*. 134(17): 3203-11.

Zarbalis, K., Siegenthaler, J. A., Choe, Y., May, S. R., Peterson, A. S., Pleasure, S. J. (2007). Cortical dysplasia and skull defects in mice with a *Foxc1* allele reveal the role of meningeal differentiation in regulating cortical development. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 104(35): 14002-7.

Zarbalis, K., Choe, Y., Siegenthaler, J. A., Orosco, L.A., Pleasure, S. J. (2012). Meningeal defects alter the tangential migration of cortical interneurons in *Foxc1<sup>hith/hith</sup>* mice. *Neural. Dev*. 7: 2.

Zhang, J., Smith, D., Yamamoto, M., Ma, L., McCaffery, P. (2003). The meninges is a source of retinoic acid for the late-developing hindbrain. *J. Neurosci*. 23(20): 7610-20.

## Raamatud

Hussar P., Hussar Ü., Kärner J., Suuroja T. 2005. *Histologia*. p.177. 2nd ed., OÜ Halo Kirjastus, Tartu 2005.

## Veebileheküljed

Tall'i uurimusgrupi lehekülg: <http://www.urmc.rochester.edu/pharmacology-physiology/research/labs/tall/Research.cfm#one>

# LIHTLITSENTS

## **Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina Kirstin Karis (sünnikuupäev: 7.aprill 1991)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihlitsentsi) enda loodud teose

### **Guaniini nukleotiidivahetus faktor RIC8 roll hiire kortikogeneesis,**

mille juhendajad on Keiu Kask ja Tambet Tõnissoo.

- 1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
  - 1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **26.05.2016** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
  3. kinnitan, et lihlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 26.05.2014